

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного підтвердження присутності
HBs-антигену вірусу гепатиту В
HBsAg-ультра-БЕСТ-підтверджуючий

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «HBsAg-ультра-БЕСТ-підтверджуючий» (далі по тексті – набір) призначений для підтвердження присутності HBs-антигену вірусу гепатиту в сироватці/плазмі крові методом імуноферментного аналізу (ІФА), заснованого на принципі нейтралізації HBsAg специфічними антитілами. Позитивний результат, отриманий в постановці будь-якого комплексу набору реагентів «HBsAg-ультра-БЕСТ», має бути підтверджений в реакції нейтралізації з використанням набору «HBsAg-ультра-БЕСТ-підтверджуючий».

1.2. Набір розрахований на проведення аналізу 44 невідомих зразків, 4 контрольних зразків, всього 48 визначень при використанні всього планшета. Для дослідження невеликої партії проб передбачено використання 2 стрипів по 8 аналізів (4 контрольних зразків і 4 невідомих зразків).

1.3. Чутливість (мінімальна концентрація HBsAg, що виявляється за допомогою даного набору) 0,01 МЕ/мл. Специфічність – 100%.

2. СКЛАД НАБОРУ

- планшет з імобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg, – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивованій (К+), – 1 фл.;
- слабкопозитивний контрольний зразок, інактивованій (К+слаб.; концентрація HBsAg (0,05±0,02) МЕ/МЛ), – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивованій (К–), – 1 фл.;
- кон'югат №1, концентрат (біотиніліровані поліклональні антитіла до HBsAg) – 1 фл.;
- кон'югат №2, концентрат (стрептавідін, кон'югований з пероксидазою хрину) – 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) – 2 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 1 (РПК №1) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 2 (РПК №2) – 1 фл.;
- розчин підтверджуючого агенту (РПА) – 1 фл.;
- розчин для розведення зразків (РРЗ) – 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР) – 1 фл.;
- тетраметілбензидін, концентрат (ТМБ) – 1 фл.;
- стоп-реагент – 1 фл.;

Примітки. набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

3. ЗАПОБІЖНІ ЗАСОБИ

При роботі з досліджувальними сироватками і контрольними зразками слід дотримуватись заходів безпеки, прийняті при роботі з потенційно інфекційним матеріалом: працювати в гумових рукавичках; не піпетувати розчини ротом; всі використані матеріали дезінфікувати відповідно до вимог чинного законодавства.

4. УСТАТКУВАННЯ І МАТЕРІАЛИ:

Фотометр вертикального сканування, шейкер – інкубатор, вошер, центрифуга лабораторна на 2,5-3,0 тис. об / хв., холодильник побутовий, піпетки напівавтоматичні одно каналні і багатоканальні рукавички гумові хірургічні, колба мірна, папір фільтрувальний, вода дистильована.

5. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ

5.1. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, каламутну сироватку крові.

5.2. Зразки сироватки (плазми) крові можна зберігати при температурі від 2 до 8°C не більше 5 діб за умови відсутності мікробної контамінації або при температурі мінус 20°C (і нижче) не більше 3 міс.

5.3. Зразки сироваток крові, що містять осад, необхідно очистити центрифугуванням при 5000–10000 об/хв протягом 5 хв при температурі від 18 до 25°C.

6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ

6.1. Перед роботою витягнути набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі компоненти при температурі 18–25°C протягом 60 хв.

6.2. ПРАВИЛА РОБОТИ ПРИ ДРОБОВОМУ ВИКОРИСТАННІ НАБОРУ

6.2.1. Розчини з флаконів відбирати лише одноразовими індивідуальними наконечниками для піпеток.

6.2.2. Після першого розтину флакони відразу щільно закрити кришками, що загвинчуються, помістити в холодильник і зберігати при 2–8С протягом всього терміну придатності набору.

6.3. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Розкрити пакет вище за замок і встановити на рамку необхідну для проведення аналізу кількість стрипів. Що залишилися невикористані стріпи негайно помістити знов в пакет з вологопоглиначем, видалити з нього повітря, щільно закрити замок і помістити в холодильник.

Зберігання: при температурі від 2 до 8°C протягом всього терміну придатності набору.

6.4. ПРИГОТУВАННЯ ПРОМИВАЮЧОГО РОЗЧИНУ

Промивальний розчин приготувати розведенням вихідного концентрату фосфатно-сольового буферного розчину з твіном в 25 разів.

Для цього відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів набору реагентів) внести до мірного циліндра необхідну кількість концентрату ФСБ-Т і довести до відповідного об'єму дистильованою водою.

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі 30–40°C до повного розчинення осаду. *Зберігання:* не більше 5 діб при 2–8°C.

6.5. ПІДГОТОВКА КОНТРОЛЬНИХ ЗРАЗКІВ

Контрольні зразки готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

6.6. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧЕГО РОЗЧИНУ КОН'ЮГАТУ № 1

Відповідно до числа використовуваних стрипів в пластикову ванну для реагентів, що входить до складу набору, внести необхідну кількість РРК № 1 і додати відповідну кількість концентрату кон'югату № 1, ретельно перемішати.

Зберігання: до 6 годин при 18–25°C.

6.7. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧЕГО РОЗЧИНУ КОН'ЮГАТУ № 2

Відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) в пластикову ванну для реагентів, що входить до складу набору, внести необхідну кількість РРК № 2 і додати відповідну кількість концентрату кон'югату № 2, ретельно перемішати. *Зберігання:* до 6 годин при 18–25°C.

6.8. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧЕГО РОЗЧИНУ ТЕТРАМЕТИЛБЕНЗИДИНУ

Відповідно до числа використовуваних стрипів у окремий чистий флакон або в пластикову ванну для реагенту внести необхідну кількість СБР, додати відповідну кількість концентрату ТМБ, ретельно перемішати.

Допустиме блакитне забарвлення робочого розчину ТМБ, яке не робить впливу на результати аналізу.

Зберігання: не більше 3 годин при 18–25°C в темному місці.

6.9. Стопи-реагент готовий до використання.

Таблиця витрат компонентів набору реагентів

| Кількість використуваних стрипів | Робочий розчин кон'югату № 1 | | Робочий розчин кон'югату № 2 | | Робочий розчин тетраметилбензидину | | Промиваючий розчин | |
|----------------------------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|------------------------------------|---------|-------------------------|-----------------------|
| | Кон'югат № 1, концентрат, мкл | РРК № 1, мкл | Кон'югат № 2, концентрат, мкл | РРК № 2, мкл | ТМБ, концентрат, мкл | СБР, мл | ФСБх25, концентрат, мкл | Дистильована вода, мл |
| 2 | 100 | 1,0 | 200 | 2,0 | 0,10 | 2,0 | 6,0 | до 150 |
| 4 | 200 | 2,0 | 400 | 4,0 | 0,20 | 4,0 | 12,0 | до 300 |
| 6 | 300 | 3,0 | 600 | 6,0 | 0,30 | 6,0 | 18,0 | до 450 |
| 8 | 400 | 4,0 | 800 | 8,0 | 0,40 | 8,0 | 24,0 | до 600 |
| 10 | 500 | 5,0 | 1000 | 10,0 | 0,50 | 10,0 | 30,0 | до 750 |
| 12 | 600 | 6,0 | 1200 | 12,0 | 0,60 | 12,0 | 36,0 | до 900 |

7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

7.1. Внесення контрольних і досліджуваних зразків. Контрольні і аналізовані зразки вносити в дублях в лунки двох стрипів – одна лунка використовується для постановки прямого ІФА (з додаванням РРЗ, що не містить нейтралізуючих антитіл НВsAg), друга – для конкурентного ІФА (з додаванням РПА, що містить нейтралізуючі антитіла НВsAg). Відповідно, стріпи слід використовувати попарно – один для постановки прямого, інший – для конкурентного ІФА.

7.2. У всі лунки стрипів для прямого ІФА (наприклад, з непарними номерами) внести по 50 мкл РРЗ, а у всі лунки стрипів для конкурентного ІФА (наприклад, з парними номерами) – по 50 мкл РПА.

7.3. Внести по 100 мкл контрольних зразків в лунки стрипів для прямого і конкурентного ІФА:

- 2 лунки — по 100 мкл K^+ ;
- 2 лунки — по 100 мкл K^+ слаб.;
- 4 лунки – по 100 мкл K^- .

Наприклад, в лунки А-1 і А-2, В-1 і В-2 внести по 100 мкл K^- , в лунки С-1, С-2 – по 100 мкл K^+ слаб., у лунки D-1, D-2 – по 100 мкл K^+ .

Внести до останніх лунок попарно по 100 мкл досліджуваних зразків.

7.4. Внести до всіх лунок по 50 мкл робочого розчину кон'югату № 1 (п. 8.6.), *не торкаючись наконечниками стінок лунок!*

7.5. Відрізати плівку необхідного розміру. Закрити лунки планшета, щільно притиснувши плівку.

Інкубувати у термо-шейкері з інтенсивністю перемішування 700 об/хв.: 40 хв. при 42°C або 60 хв. при 37°C.

7.6. Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в судину з дезінфікуючим розчином. За допомогою промивального пристрою* промити лунки планшета 5 разів промивальним розчином, чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стріпу. У кожен лунку вносити не менше 400 мкл рідини в процесі кожного циклу промивання. Час між заповненням і спорожненням лунок має бути не менше 30 сек. Необхідно досягати повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. По закінченні промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному паперу.

Примітка: Промивання за допомогою автоматичного промивача рекомендується проводити в режимі з переповненням («Overflow») з 5-ма циклами промивання і внесенням до лунок по 600–700 мкл робочого промивального розчину. При цьому слід використовувати поперечну аспірацію розчину з лунок (режим «Crosswise»).

7.7. Внести до всіх лунок по 100 мкл робочого розчину кон'югату № 2.

Для внесення робочого розчину кон'югату № 2 використовувати пластикову ванночку й одноразові наконечники, що входять до складу набору.

7.8. Відрізати плівку необхідного розміру. Закрити лунки планшета, щільно притиснувши плівку.

Інкубувати в термо-шейкері з інтенсивністю перемішування 700 об/хв.: 30 хв. при 42°C або 50 хв. при 37°C.

7.9. Після закінчення другої інкубації вміст лунок видалити в судину з дезінфікуючим розчином і промити планшет 5 разів як описано в п. 7.6.

7.10. Внести до всіх лунок по 100 мкл робочого розчину ТМБ та інкубувати в темному місці протягом 30 хв. при температурі 18–25°C.

7.9. Внести до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.

8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти величину оптичної щільності розчинів в лунках на спектрофотометрі вертикального сканування в двохвольовому режимі: при основній довжині хвилі 450 нм і довжині хвилі порівняння в діапазоні 620–655 нм; допускається вимір на одній довжині хвилі – 450 нм.

Час між зупинкою реакції і виміром оптичної густини не повинен перевищувати 5 хв.

9. КОРОТКА СХЕМА ІФА

Використовувати лише після ретельного ознайомлення з інструкцією!

9.1. ТЕРМОШЕЙКЕР, 42°C

Внести: по 50 мкл РРЗ та РПА.

Внести: 100 по 100 мкл K^+ , K^+ слаб., K^- , аналізованих зразків.

Внести: по 50 мкл. робочого розчину кон'югату № 1.

Інкубувати: 40 хв., 700 об/хв.

Промити: промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл робочого розчину кон'югату №2.

Інкубувати: 30 хв., 700 об/хв.

Промити: промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.

Інкубувати: 30 хв. при 18–25°C в темному місці.

Внести: по 100 мкл стоп-реагенту.

Виміряти: ОГ при 450 нм / референсна довжина хвилі 620–655 нм.

9.2. ТЕРМОШЕЙКЕР, 37°C

Внести: по 50 мкл РРЗ та РПА.

Внести: по 100 мкл K^+ , K^+ слаб., K^- , аналізованих зразків.

Внести: по 50 мкл. робочого розчину кон'югату № 1.

Інкубувати: 60 хв., 700 об/хв.

Промити: промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.
Внести: по 100 мкл робочого розчину кон'югату №2.
Інкубувати: 30 хв., 700 об/хв.
Промити: промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.
Внести: по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.
Інкубувати: 30 хв. при 18–25°C в темноті.
Внести: по 100 мкл стоп-реагенту.
Виміряти: ОГ при 450 нм / референсна довжина хвилі 620–655 нм.

10. РОЗРАХУНКИ І ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

10.1. РОЗРАХУНКИ

10.1.1. Розрахувати середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком – ОГ_{сер. К⁻}.

10.1.2. Середнє значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком не повинне перевищувати 0,15 од. опт. густини.

10.1.3. Значення ОГ К⁻ в кожній лунці повинне знаходитися в межах від 0,6 х ОГ_{сер. К⁻} до 1,4 х ОГ_{сер. К⁻}. Значення ОГ К⁻, що виходить з цих меж, слід виключити, а ОГ_{сер. К⁻} перерахувати.

10.1.2. Вирахувати критичне значення оптичної густини (ОГ_{крит.}) за формулою:

$$\text{ОГ}_{\text{крит.}} = \text{ОГ}_{\text{сер. К}^-} + 0,05$$

10.2. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

10.2.1. Значення оптичної густини в лунці з позитивним контрольним зразком для прямого ІФА має бути не менше 1,0 од. опт. густини. і знижуватися на 50% і більш в лунці для конкурентного ІФА.

10.2.2. Значення оптичної густини в лунці для прямого ІФА із слабо позитивним контрольним зразком повинно бути більше ОГ_{крит.} і знижуватися на 50% і більше в лунці для конкурентного ІФА.

10.2.3. Результат аналізу вважають негативним якщо ОГ зразка < ОГ_{крит.}, де: ОГ зразка. – оптична густина аналізованих зразків.

10.2.4. Якщо ОГ аналізованого зразка (ОГ зразка.) в прямому ІФА \geq ОГ_{крит.}, слід обчислити % зменшення сигналу в конкурентному ІФА по формулі:

$$\% \text{ зменшення} = \frac{\text{ОГ}_{\text{прям.}} - \text{ОГ}_{\text{конк.}}}{\text{ОГ}_{\text{прям.}} - \text{ОГ}_{\text{сер. К}^-}} \times 100 \%$$

10.2.5. Якщо ОГ зразка. у прямому ІФА рівно або перевищує ОГ_{крит.}, а міра зменшення сигналу 50% і більше, то досліджуваний зразок визнають, позитивним, HBsAg, що містить (результат підтверджується).

10.2.6. Якщо ОГ зразка. у прямому ІФА більше або рівна ОГ_{крит.}, а в конкурентному ІФА міра зменшення сигналу менше 50%, то досліджуваний зразок слід розвести послідовно в 400 і 4000 разів розчином для розведення зразків (РРЗ) і повторити аналіз.

10.2.7. Якщо після розведення зразка ОГ зразка. у прямому ІФА перевищує або рівна ОГ_{крит.} і міра придушення сигналу в конкурентному ІФА 50% і більше, то зразок визнають позитивним, HBsAg, що містить (результат підтверджується).

10.2.8. Якщо після розведення зразка ОГ зразка. у прямому ІФА перевищує або рівна ОГ_{крит.}, а міра зменшення сигналу в конкурентному ІФА менше 50%, то це вказує на неспецифічну реакцію аналізованого зразка. У такому разі зразок визнають негативним, що не містить HBsAg.

10.2.9. Якщо після розведення ОГ зразка. у прямому ІФА менше ОГ_{крит.}, зразок визнають негативним, що не містить HBsAg, (результат не підтверджується).

11. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°С не більше 10 діб.

Не допускати заморожування!

Термін придатності набору реагентів – 14 місяців з дня випуску.

З питань, що стосуються якості набору, звертатися в ТОВ «Бест Діагностик» за адресою:

04074, м. Київ-74, вул.Лугова, 9,

тел./факс: (044) 500-57-11

e-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.