

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів
для якісного та кількісного визначення антитіл
до HBs-антигену вірусу гепатиту В
«HBsAg-антитіла-БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «HBsAg-антитіла-БЕСТ» (далі по тексту - набір) призначений для якісного та кількісного визначення антитіл до HBs-антигену вірусу гепатиту В (анти-HBsAg) в сироватці (плазмі) крові людини методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА).

1.2. При використанні всього планшета набір розрахований на проведення аналізу 48 визначень, включаючи контролю (кількісний варіант); або 96 визначень, включаючи контролю (якісний варіант).

1.3. Набір адаптований для постановки ІФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («MULTISCAN», виробник «Labsystems», «TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD» тощо).

2. СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованим рекомбінантним HBsAg - 1 шт.
- кон'югат (рекомбінантний HBsAg, мічений пероксидазою хрому) - 1 фл.;
- калібрувальні зразки, що містять анти-HBsAg: 10, 50, 100 і 200 мМО / мл - 4 фл.;
- калібрувальний зразок, який не містить анти-HBsAg: 0 мМО / мл - 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твін (ФСБ-Т × 25) - 1 фл.;
- розчин тетраметілбензидіна (розчин ТМБ) - 1 фл.;
- стоп-реагент - 1 фл., 12 мл;
- трафарет для побудови калібрувального графіка - 1 шт.

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

3. АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфічність: 100%

Чутливість: 100%

Аналітична чутливість: 1 мМО / мл.

4. ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ

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.

5. ОБЛАДНАННЯ 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.

6. ЗРАЗКИ ЩО АНАЛІЗУЮТЬСЯ

6.1. Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізованих, каламутну сироватку крові.

6.2. Зразки сироватки (плазми) крові можна зберігати при температурі від 2 до 8 ° С не більше 5 діб за умови відсутності мікробної контамінації або при температурі мінус 20 ° С (і нижче) не більше 3 міс. Слід уникати багаторазового заморожування / відтавання, так як це може призвести до отримання неправильних результатів. Після розморожування зразки слід ретельно перемішати.

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

6.4. Для відбору досліджуваних зразків та компонентів набору реагентів використовувати напівавтоматичні піпетки з похибкою вимірювання обсягів не більше 5%.

6.5. Перед постановкою ІФА аналізовані зразки витримати при температурі від 18 до 25 ° С не менше 60 хв.

7. ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

7.1. Перед роботою витягти набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі компоненти набору, в тому числі і запечатаний пакет з планшетом, при температурі від 18 до 25 ° С не менше 60 хв.

7.2. Калібрувальні зразки, кон'югат, розчин ТМБ і стоп-реагент готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

7.3. ПРАВИЛА РОБОТИ ПРИ ДОБОВОМУ ВИКОРИСТАННІ НАБОРУ

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

7.3.2. Після першого розкриття флакони відразу щільно закрити загвинчуються кришками, помістити в холодильник і зберігати при 2-8 ° С протягом усього терміну придатності набору.

7.4. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТ

Розкрити пакет вище замку і встановити на рамку необхідне для проведення аналізу кількість стрипів. Решта невикористані стрипи негайно помістити знову в пакет з вологопоглиначем, видалити з нього повітря, щільно закрити замок і помістити в холодильник.

Зберігання: при температурі від 2 до 8 ° С протягом усього терміну придатності набору.

7.5. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНУ ДЛЯ ПРОМИВАННЯ

Промивний розчин приготувати розведенням вихідного концентрату фосфатно-сольового буферного розчину з твін в 25 разів. Для цього відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) внести в мірний циліндр необхідну кількість концентрату ФСБ-Т і довести до відповідного об'єму дистильованою водою.

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі від 30 до 40 ° С до повного розчинення осаду.

Зберігання: не більше 5 діб при 2-8 ° С.

7.6. ПІДГОТОВКА КОН'ЮГАТУ

Залежно від кількості використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість кон'югату.

Залишки кон'югату з флакона або ванночки утилізувати (не зливати у флакон з вихідним кон'югатом).

7.7. ПІДГОТОВКА РОЗЧИНУ ТМБ

Залежно від кількості використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів), відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість розчину ТМБ.

Залишки розчину ТМБ з флакона або ванночки утилізувати.

Увага! Для роботи з розчином ТМБ необхідно використовувати тільки одноразові наконечники. Посуд, призначену для розчину ТМБ, не можна відмивати із застосуванням синтетичних миючих засобів, оскільки навіть їхні сліди ведуть до неконтрольованого окислення ТМБ в ході реакції. Після роботи посуд обполоснути водою, промити 70% етиловим спиртом і ретельно відмити дистильованою водою.

8. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Увага! При постановці ІФА на автоматичних аналізаторах інкубації з зразками і кон'югатом проводити тільки в режимі «30 хв, 37 ° С, шейкер».

При дробовому використанні набору не поміщати флакони, що входять до складу набору, в камеру аналізатора, а для кожної постановки необхідну кількість компонентів відбирати в окрему чисту ємність. Виняток становить стоп, не вимагає зберігання в холодильнику протягом усього терміну придатності.

8.1. Для постановки кількісного варіанту аналізу внести в дублях, починаючи з верхніх лунок перших двох стрипів, по 100 мкл калібрувальних зразків 0, 10, 50, 100 і 200 мМО / мл.

Для постановки якісного аналізу в лунки А-1 і В-1 внести по 100 мкл калібрувального зразка 0 мМО / мл, в лунки С-1 і D-1 - по 100 мкл калібрувального зразка 10 мМО / мл, в лунку Е-1 - 100 мкл калібрувального зразка 200 мМО / мл.

В інші лунки внести по 100 мкл цілісних досліджуваних зразків.

Для кількісного аналізу аналізовані зразки вносити в дублях.

Час внесення зразків не повинно перевищувати 10 хв при використанні всіх лунок планшета.

8.2. Відрізати плівку для заклеювання планшета необхідного розміру. Стрипи закрити, щільно притиснувши плівку. Інкубувати 30 хв при температурі 37 ° С в термошейкер при 700 об / хв або 1 годину в термостаті при температурі 37 ° С.

8.3. Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в посудину з дезинфікуючим розчином. За допомогою промивного пристрою промити лунки планшета 5 разів розчином для промивання (п. 7.5.), Чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипа. У кожен лунку вносити не менш 400 мкл рідини в процесі кожного циклу промивання. Час між заповненням і спорожненням лунок повинно бути не менше 30 сек. Необхідно добиватися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Після закінчення промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

8.4. Внести до всіх лунок по 100 мкл кон'югату, заклеїти планшет плівкою.

Інкубуйте 30 хв при температурі 37 ° С в термошейкер при 700 об / хв або 1 годину в термостаті при температурі 37 ° С.

Для внесення кон'югату використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, входять до складу набору.

8.5. Після закінчення другої інкубації стрипи промити 5 разів, як описано в п.8.3.

8.6. Внести до всіх лунок по 100 мкл розчину ТМБ і інкубувати у темряві протягом 25 хв при температурі 18-25 ° С.

Для внесення розчину ТМБ використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

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

9. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти величину оптичної щільності розчинів у лунках на спектрофотометрі вертикального сканування у двохвильовому режимі: при основній довжині хвилі 450 нм і довжині хвилі порівняння в діапазоні 620-655 нм. Допускається вимір оптичної щільності в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм.

Час між зупинкою реакції і вимірюванням оптичної щільності не має перевищувати 5 хв.

10. КОРОТКА СХЕМА ІФА

Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією!

10.1. ПРИ ВИКОРИСТАННІ ТЕРМОСТАТА

Внести: *якісний аналіз:*

по 100 мкл калібрувальних зразків 0, 10 і 200 мМО / мл;

по 100 мкл цілісних аналізованих зразків.

кількісний аналіз:

по 100 мкл калібрувальних зразків 0, 10, 50, 100 і 200 мМО / мл в дублях;

по 100 мкл цілісних аналізованих зразків у дублях.

Інкубувати: 1 година, 37 ° С.

Промити: розчином для промивання, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл кон'югату.

Інкубувати: 1 година, 37 ° С.

Промити: розчином для промивання, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл розчину ТМБ.

Інкубувати: 25 хв, 18-25 ° С, в темряві.

Внести: 100 мкл стоп-реагенту.

Виміряти: ВП при 450 нм / референсна довжина хвилі 620-655 нм.

10.2. ПРИ ВИКОРИСТАННІ ТЕРМОСТАТУЄМОГО ШЕЙКЕРА ОРБІТАЛЬНОГО ТИПУ

Внести: *якісний аналіз:*

по 100 мкл калібрувальних зразків 0, 10 і 200 мМО / мл;

по 100 мкл цілісних аналізованих зразків.

кількісний аналіз:

по 100 мкл калібрувальних зразків 0, 10, 50, 100 і 200 мМО / мл в дублях;

по 100 мкл цілісних аналізованих зразків у дублях.

Інкубувати: 30 хв, 37 ° С, 700 об / хв.

Промити: розчином для промивання, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл кон'югату.

Інкубувати: 30 хв, 37 ° С, 700 об / хв.

Промити: розчином для промивання, 400 мкл, 5 разів.

Внести: по 100 мкл розчину ТМБ.

Інкубувати: 25 хв, 18-25 ° С, в темряві.

Внести: 100 мкл стоп-реагенту.

Виміряти: ВП при 450 нм / референсна довжина хвилі 620-655 нм.

11. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ РЕАКЦІЇ

11.1. Для оцінки результатів аналізу обчислити критичне значення оптичної щільності (ОГ_{крит}) за формулою:

$$\text{ОГ}_{\text{крит}} = \text{ОГ}_0 + 0,07$$

де ОГ₀ - середнє арифметичне значення оптичної густини у лунках з калібрувальним зразком 0 мМО / мл.

Негативне значення ВП калібрувального зразка 0 мМО / мл вважати рівним нулю.

11.2. Результати дослідження враховують тільки при дотриманні наступних умов:

$\text{ОГ}_0 \leq 0,20$ о.е.; $\text{ОГ}_{200} \geq 1,40$ о.е.; $\text{ОГ}_{10} \geq \text{ОГ}_{\text{крит}}$. де ОГ₂₀₀ і ОГ₁₀ - середні арифметичні значення оптичної щільності у лунках з калібрувальними зразками 200 і 10 мМО / мл.

11.3. Результат аналізу вважати **позитивним**, якщо $\text{ОГ}_z \geq \text{ОГ}_{10}$,

де ОГ_z - оптична густина в лунці з досліджуваним зразком.

Результат аналізу вважати **сумнівним**, якщо $\text{ОГ}_{\text{крит}} \leq \text{ОГ}_z < \text{ОГ}_{10}$.

Результат аналізу вважають **негативним**, якщо $\text{ОГ}_z < \text{ОГ}_{\text{крит}}$. (Такі зразки кількісному аналізу не підлягають).

11.4. У разі кількісного варіанту аналізу для визначення концентрації анти-НВс в аналізованих зразках необхідно побудувати в лінійних координатах калібрувальний графік залежності оптичної густини (вісь ординат) від концентрації анти-НВс в калібрувальних зразках (вісь абсцис). Для цього обчислити середні арифметичні значення оптичної густини у лунках з калібрувальними зразками.

На прикладеному трафареті для побудови графіка проти концентрації кожного калібрувального зразка відкласти відповідне їй середнє значення оптичної густини. Послідовно з'єднати отримані точки відрізками прямих ліній.

Визначити зміст концентрації анти-НВс в аналізованому зразку по каліброваному графіку. Для цього на осі ординат відзначити середнє значення ОГ аналізованого зразка. Провести пряму лінію, паралельно осі абсцис, до перетину з калібрувальним графіком. Від точки перетину опустити перпендикуляр на вісь абсцис. За отриманою точці перетину визначити значення концентрації анти-НВс в зразку, виражене в мМО / мл.

Приклад калібрувального графіка представлений на малюнку.

11.5. Якщо концентрація анти-НВs в зразку більше 200 мМО / мл, аналіз слід повторити, розвівши зразок у 20 разів (в лунку внести 95 мкл калібрувального зразка 0 мМО / мл

та 5 мкл досліджуваного зразка). Якщо концентрація анти-НВs в розведеному зразку перевищує 200 мМО / мл, вихідний досліджуваний зразок розвести в 400 разів. У разі розведення аналізованих зразків необхідно отриману концентрацію анти-НВs помножити на фактор розведення.

За даними ВООЗ протективного є рівень концентрації анти-НВs - 10 мМО / мл.

11.6. При динамічному спостереженні

пацієнта для отримання результатів, адекватно відображають зміну концентрації анти-НВs в крові, необхідно використовувати набори реагентів одного найменування (одного підприємства-виробника).

12. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ НАБОРУ

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 в разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.