

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення імуноглобулінів класу М до вірусу гепатиту дельта
«Геп D-IgM-БЕСТ»

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «Геп D-IgM-БЕСТ» (далі по тексті - набір) призначений для імуноферментного виявлення імуноглобулінів класу М до вірусу гепатиту Дельта в сироватці (плазмі) крові людини.

2. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Визначення IgM до вірусу гепатиту Дельта (ВГД) проводиться методом імуноферментного аналізу. Метод заснований на взаємодії IgM, що містяться в сироватці крові, з моноклональними антитілами проти IgM людини, іммобілізованими в лунках полістиролових планшета.

3. СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованими моноклональними антитілами до імуноглобулінів класу М людини - 1 шт.
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+) - 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К-) - 1 фл.
- розчин для попереднього розведення сироваток (РПРС) - 1 фл.
- кон'югат рекомбінантного антигену ВГД, міченого пероксидазою хрому - 1 фл.
- розчин для розведення сироваток (РРС) - 1 фл 12 мл.
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Т × 25) - 2 фл.;
- розчин тетраметілбензідіна (розчин ТМБ) - 1 фл.
- стоп-реагент - 1 фл.

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

4. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

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, НЕОБХІДНІ ПРИ РОБОТІ З НАБОРОМ

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 привести 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%. Слід звернути увагу на точне дозування і ретельне перемішування сироваток з розчином, використовуваним для їх розведення. Від дотримання цих вимог залежить точність і відтворюваність результатів аналізу.

7. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ І РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ІФА

7.1. Перед проведенням аналізу досліджувані зразки і всі компоненти набору, в тому числі і запечатаний пакет з планшетом, слід витримати при температурі від 18 до 25 ° С не менше 60 хв.

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

7.3. ПРАВИЛА РОБОТИ ПРИ ДРОБОВОМУ ВИКОРИСТАННІ НАБОРУ

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

7.3.2. Після відбору частини вмісту флакони відразу щільно закрити кришками, помістити в холодильник і зберігати при температурі 2-8 ° С протягом усього терміну придатності набору.

7.4. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТУ

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 терміну придатності набору.

7.5. ПІДГОТОВКА ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ

Досліджувані зразки розвести в 10 разів розчином для попереднього розведення сироваток. Для цього внести в лунки допоміжного планшета по 90 мкл розчину і додати по 10 мкл цілісного зразка сироватки (плазми), ретельно перемішати. При цьому колір розчину має змінитися з малинового на жовтий. Якщо зміни кольору не сталося, даний зразок може дати неправильний результат. **Зберігання:** до 3 год. при 18-25 ° С.

7.7. ПІДГОТОВКА КОН'ЮГАТУ

Відповідно до числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) відібрати в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість кон'югату.

Залишки кон'югату з пластикової ванночки утилізувати (не зливати у флакон з вихідним кон'югатів!).

7.8. ПІДГОТОВКА РОЗЧИНУ ТМБ

Відповідно до числа використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів), відібрати в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість розчину ТМБ.

Залишки розчину ТМБ з пластикової ванночки утилізувати (не зливати у флакон з вихідним розчином ТМБ!).

8. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Увага! Внесення контрольних та досліджуваних зразків проводити досить швидко, протягом 10-15 хв, так як при більш тривалому внесенні зразків в лунки планшету час інкубації першого і останнього зразків значно відрізняється, що може привести до неправильної оцінки результатів.

8.1. Внести контрольні зразки:

- 1 лунка - 100 мкл К +;
- 2 лунки - по 100 мкл К-.

Наприклад, в лунки А-1 і В-1 внести по 100 мкл К-, в лунку С-1 внести 100 мкл К +.

В інші лунки внести по 90 мкл РРС і по 10 мкл попередньо розведених досліджуваних сироваток (п. 7.5.). Таким чином, досліджувана сироватка в лунці розбавляється в 100 разів.

Відрізати плівку необхідного розміру. Планшет закрити, щільно притиснувши плівку. Інкубуйте 60 хв при 37 ° С.

8.2. Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в посудину з дезінфікуючим розчином. За допомогою промивного пристрою промити лунки планшета 5 разів розчином для промивання (п. 7.6.). Чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипу. 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 домагатися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Після закінчення промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

8.3. Внести в усі лунки по 100 мкл кон'югату (п. 7.7.). Відрізати плівку необхідного розміру. Лунки планшета закрити плівкою. Інкубуйте 60 хв при 37 ° С.

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

8.4. Після закінчення другої інкубації видалити вміст лунок і промити стрипи 5 раз так, як зазначено в п. 8.2.

8.5. Внести в кожен лунку по 100 мкл розчину тетраметілбензідіна (п. 7.8.) І витримати в темряві протягом 25 хв при температурі 18-25 ° С.

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

8.6. Зупинити реакцію додаванням в лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

У разі потрапляння на шкіру розчину ТМБ або стоп-реагенту необхідно негайно змити їх водою з милом.

9. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти величину оптичної щільності розчинів в лунках на спектрофотометрі вертикального сканування в двохвильовому режимі: основний фільтр - 450 нм, референс-фільтр в діапазоні 620-655 нм. Допускається вимір оптичної щільності на одній довжині хвилі - 450 нм.

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

10. КОРОТКА СХЕМА ІФА

Внести:	по 100 мкл К +, К-; по 90 мкл РРС і по 10 мкл попередньо розведених досліджуваних сироваток.
Інкубуйте:	60 хв, 37 ° С.
Промити:	промивний розчин, 400 мкл, 5 разів.
Внести:	по 100 мкл кон'югату.
Інкубуйте:	60 хв, 37 ° С.
Промити:	промивний розчин, 400 мкл, 5 разів.
Внести:	по 100 мкл розчину тетраметілбензідіна.
Інкубуйте:	25 хв, 18-25 ° С, в темряві.
Внести:	по 100 мкл стоп-реагенту.
Виміряти:	ОЩ при 450 нм / референсна довжина хвилі - 620-655 нм.

11. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

11.1. Розрахувати середнє арифметичне значення оптичної щільності в лунках з негативним контрольним зразком (ОЩсер.К-).

11.2. Середнє значення оптичної щільності в лунках з негативним контрольним зразком не повинно перевищувати 0,25 од. опт. щільності.

Значення оптичної щільності в лунці з позитивним контрольним зразком повинно бути не менше 0,60 од. опт. щільності.

11.3. Оцінку результатів проводити за умови повного виконання положень п. 11.2.

11.4. На підставі отриманих даних обчислити критичне значення оптичної щільності (ОЩкрит.) за формулою:

$$\text{ОЩкрит.} = \text{ОЩсер.К} + 0,20$$

11.5. Результат аналізу вважають позитивним, якщо $\text{ОЩобр.} \geq \text{ОЩкрит.}$,

де ОЩобр. - Оптична щільність в лунці з досліджуваним зразком.

Результат аналізу вважають негативним, якщо $\text{ОЩобр.} < \text{ОЩкрит.}$.

11.6. При динамічному спостереженні пацієнта для отримання результатів, адекватно відображають зміну концентрації імуноглобулінів класів М до вірусу гепатиту Дельта в крові, необхідно використовувати набори реагентів одного найменування (одного підприємства-виробника).

12. 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 вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.