

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Генеральний директор
ТОВ «Бест Діагностик»
_____ О.В. Шкурдай
«__» _____ 20__ р.

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

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

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

1.1. Набір реагентів «Геп Е-IgM - БЕСТ» призначений для імуноферментного виявлення імуноглобулінів класу М до вірусу гепатиту Е (ВГЕ) в сироватці (плазмі) крові людини методом імуноферментного аналізу (ІФА) і може бути використаний в клінічних та епідеміологічних дослідженнях для діагностики гепатиту.

1.2. Набір розрахований на проведення 96 аналізів, включаючи контрольні зразки. Для дослідження невеликих партій проб можливі 12 незалежних постановок по 8 аналізів кожна, включаючи контрольні зразки.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРУ

2.1 ПРИНЦИП МЕТОДУ

В лунках планшета при додаванні досліджуваного або контрольного зразка під час першої інкубації відбувається зв'язування наявних у зразку імуноглобулінів класу М до ВГЕ з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок рекомбінантними антигенами ВГЕ.

Під час другої інкубації зв'язалися імуноглобуліни класу М до ВГЕ взаємодіють з доданим до лунки кон'югатом моноклональних антитіл до IgM людини, мічених пероксидазою хрому.

Комплекс «антиген-антитіло-кон'югат» виявляють кольоровий реакцією з використанням субстрату пероксидази - перекису водню і хромогену - тетраметілбензідіна. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації IgM до ВГЕ в аналізованому зразку.

2.2 СКЛАД НАБОРУ

- планшет розбірний з іммобілізованими рекомбінантними антигенами ВГЕ - 1 шт.
- позитивний контрольний зразок, інактивований (К+) - 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (К-) - 1 фл.;
- розчин для розведення сироваток (РРС) - 1 фл.;
- кон'югат моноклональних антитіл до IgG людини з пероксидазою хрому - 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину с Твін (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.

2.3 АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

2.3.1. **Специфічність** становить 100%.

2.3.2. **Чутливість** становить 100%.

3. 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.

4. 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.

5. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ

5.1. Для аналізу не слід брати гемолізованих, каламутну сироватку крові.

5.2. 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. Необхідно уникати багаторазові заморожування / відтавання зразків, так як це може призвести до отримання неправильних результатів. Після розморожування зразки слід ретельно перемішати.

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 ° С.

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

6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

6.1. 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.

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

6.3. ПРАВИЛА РОБОТИ ПРИ ДРОБОВОМУ ВИКОРИСТАННІ НАБОРУ

6.3.1. Перед використанням вміст флаконів струснути.

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

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

6.4. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТУ

Розкрити пакет вище замку і встановити на рамку необхідне для проведення аналізу кількість стрипів. Невикористані стрипи слід знову помістити в пакет з вологопоглиначем, щільно закрити замок і покласти в холодильник

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

6.5. ПРИГОТУВАННЯ ПРОМИВАЮЧОГО РОЗЧИНУ

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 набору реагентів) 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.

6.6. ПІДГОТОВКА КОН'ЮГАТУ

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

Залишки використаного кон'югату не можна зливати у флакон з вихідним кон'югатом.

Зберігання: до 3 годин при 18-25 ° С.

6.7. ПІДГОТОВКА РОЗЧИНУ ТМБ

Відповідно до числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість розчину ТМБ. Залишки використаного ТМБ не можна зливати у флакон з вихідним ТМБ. Зберігання: не більше 3 годин при 18-25 ° С в темряві.

7. ПРОВЕДЕННЯ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

7.1. Внести контрольні зразки:

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

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

В інші лунки внести по 90 мкл РРС і по 10 мкл досліджуваних зразків, ретельно перемішати піпетування, при цьому колір розчину змінюється з фіолетового на синій. Таким чином, досліджувана сироватка розбавляється в лунці в 10 разів.

Для підвищення достовірності результатів постановку досліджуваних зразків рекомендується проводити в дублях, використовуючи для кожного зразка по дві лунки.

Планшет закрити плівкою і інкубувати 30 хв при 37 ° С.

7.2. 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. 6.5.), 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 добиватися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. Після закінчення промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному папері.

7.3. У всі лунки внести по 100 мкл кон'югату (п. 6.6.).

Планшет закрити плівкою і інкубувати 30 хв при 37 ° С.

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

7.4. Після закінчення другої інкубації промити планшети 5 разів так, як зазначено в п. 7.2.

7.5. Внести до всіх лунок планшета по 100 мкл розчину ТМБ (п. 6.7.). Планшет помістити в захищене від світла місце і витримати протягом 25 хв при температурі 18-25 ° С.

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

7.6. Зупиніть реакцію додаванням в лунки по 100 мкл стоп-реагенту.

8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

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

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

9. КОРОТКА СХЕМА ІФА

Використовувати тільки після уважного ознайомлення з інструкцією!

- Додати:** по 100 мкл К +, К-;
по 90 мкл РРС і по 10 мкл досліджуваних зразків.
- Інкубувати:** 30 хв, 37 ° С.
- Промити:** промивання розчином, 400 мкл, 5 разів.
- Додати:** по 100 мкл кон'югату.
- Інкубувати:** 30 хв, 37 ° С.
- Промити:** промивання розчином, 400 мкл, 5 разів.
- Додати:** по 100 мкл розчину ТМБ.
- Інкубувати:** 25 хв, 18-25 ° С в темряві.
- Додати:** 100 мкл стоп-реагенту.
- Виміряти:** ВП при 450 нм / референсна довжина хвилі - 620-655 нм.

10. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ РЕАКЦІЇ

10.1. Розрахувати середнє арифметичне значення оптичної щільності у лунках з негативним контрольним зразком ОЩср.К-.

10.2. Середнє значення оптичної щільності у лунках з негативним контрольним зразком повинно бути не більше 0,20 о.е.

Значення оптичної щільності в лунці з позитивним контрольним зразком повинно бути не менше 0,0 о.е.

10.3. Оцінку результатів проводити за умови повного виконання положень п.10.2.

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

$$\text{ОЩкріт.} = \text{ОЩср.К-} + 0,2.$$

10.4. Результат аналізу вважають негативним, якщо ОЩобр. < ОЩкріт ..

Результат аналізу вважають позитивним, якщо ОЩобр. \geq ОЩкріт ..

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

11. 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 вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

С.н.с. лабораторії епідеміології парентеральних вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції, к.б.н.

О.В. Максименко

Н.с. лабораторії епідеміології парентеральних вірусних гепатитів та ВІЛ-інфекції

О.М. Кислих