

НАБІР ІФА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ АБО ПІДТВЕРДЖЕННЯ ПОВЕРХНЕВОГО АНТИГЕНУ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В

В-1156, ДС-ІФА-НВsAg

Каталог. №: В-1156

Методика від 02-08-2010

Виробник : ДС (Росія)



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Набір реагентів випускається у вигляді чотирьох комплектів. Комплекти № 1, 2, 3 - для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В:

комплект №1 розрахований на проведення 96 (один розбірний планшет) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки з можливістю дробового (по одній смужці) використання набору або для одночасної постановки 96 визначень на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу;

комплект №2 розрахований на проведення 192 (два розбірних планшета) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки з можливістю дробового (по одній смужці) використання набору або для одночасної постановки 192 (96 x 2) визначень на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу;

комплект №3 розрахований на проведення 480 (п'ять розбірних планшетів) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки з можливістю дробового (по одній смужці) використання набору або для постановки 480 (96 x 5) визначень на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу;

Комплект №4 - для підтвердження поверхневого антигену вірусу гепатиту В розрахований на проведення 48 (один розбірний планшет) визначень, включаючи контрольні, призначений для ручної постановки з можливістю дробового (по дві смужки) використання набору або для одночасної постановки 48 визначень на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу.

I. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів "ДС-ІФА-НВsAg" призначений для виявлення або підтвердження поверхневого антигену вірусу гепатиту В в сироватці (плазмі), лейкоцитарному інтерфероні, імуноглобулінах, альбумінах та інших препаратах приготуваних із сироватки (плазми) крові людини методом імуноферментного аналізу. Можливе виявлення або підтвердження реакцією нейтралізації як диких типів, так і мутантних варіантів поверхневого антигену вірусу гепатиту В.

Чутливість набору (мінімальна кількість антигену вірусу гепатиту В, який виявляється) - 0,1 МОд/мл (термостат); 0,05 МОд/мл (термостатований шейкер).

II. СКЛАД НАБОРУ "ДС-ІФА-НВsAg"

Таблиця 1

Характеристики реагентів	Форма випуску			
	Комплект №1	Комплект №2	Комплект №3	Комплект №4
Імуносорбент - полістироловий розбірний планшет з прозорими безбарвними лунками, в яких сорбовані моноклональні антитіла миші до НВsAg (анти-НВs).	1 планшет	2 планшета	5 планшетів	1 планшет
Кон'югат (концентрат x11) - анти-НВs, мічені пероксидазою хрому. Прозора або опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина.	1 флакон 0,75 мл	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 0,75 мл
РРК (розчин для розведення кон'югату) - опалесцююча блакитного кольору рідина, допустимо утворення осаду, що розчиняється при	1 флакон 8,0 мл	1 флакон 20,0 мл	2 флакона по 20,0 мл	1 флакон 8,0 мл

струшуванні.				
К+1 (контрольний позитивний зразок) - рекомбінантний НВsAg або очищений плазмовий НВsAg в сироватці крові людини, яка не містить антитіла до НВsAg, ВІЛ-1, 2 і вірусу гепатиту С, інактивованої прогріванням. Прозора або злегка опалесцююча червоного кольору рідина.	1 флакон 2,0 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 4,0 мл	1 флакон 3,0 мл
К+2 (контрольний слабопозитивний зразок), ліофілізований або рідкий - рекомбінантний НВsAg або очищений плазмовий НВsAg з концентрацією 0,150 ± 0,05 МОд/мл в сироватці крові людини, яка не містить антитіла до НВsAg, ВІЛ-1, 2 і вірусу гепатиту С, інактивованої прогріванням. Суха пориста аморфна маса, білого або світло-жовтого кольору або опалесцююча світло-жовтого кольору рідина.	1 флакон 1,0 мл	2 флакона 1,0 мл	5 флаконов 3,0 мл	
К- (контрольний негативний зразок) - сироватка крові людини, яка не містить антитіла до ВІЛ-1, 2, НВsAg, антитіла до вірусу гепатиту С; інактивована нагріванням. Прозора або опалесцююча зеленого кольору рідина.	1 флакон 4,0 мл	2 флакона 4,0 мл	2 флакона 4,0 мл	1 флакон 5,0 мл
АНТИ-НВs-ПЛЮС - козячі антитіла, що містять антитіла до НВsAg, внесені в сироватку крові людини, що не містить НВsAg, антитіла до НВsAg, ВІЛ-1, 2 і вірусу гепатиту С, інактивовану прогріванням. АНТИ-НВs-ПЛЮС - ліофілізований, суха пориста аморфна маса, рожевого кольору або АНТИ-НВs-ПЛЮС - рідкий, прозора рожевого кольору рідина.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
АНТИ-НВs-МІНУС - козячі антитіла, що не містять антитіла до НВsAg, внесені в сироватку крові людини, що не містить НВsAg, антитіла до НВsAg, ВІЛ-1, 2 і вірусу гепатиту С, інактивовану прогріванням. АНТИ-НВs-МІНУС - ліофілізований, суха пориста аморфна маса, блакитного кольору або АНТИ-НВs-МІНУС - рідкий, прозора блакитного кольору рідина.	-	-	-	1 флакон 2,0 мл
Промивний розчин (концентрат x 25). Прозора або злегка опалесцююча безбарвна або світло-жовтого кольору рідина, допустимо утворення осаду, повністю розчиняється при температурі від 35 до 39 °С і струшуванні.	1 флакон 50,0 мл	1 флакон 80,0 мл	3 флакона по 80,0 мл або 2 флакона по 120,0 мл	1 флакон 50,0 мл
СБ - субстратний буферний розчин, цитратний буфер, що містить розчин водню перекису. Прозора безбарвна рідина.	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл або 1 флакон 50,0 мл	5 флаконов по 25,0 мл або 3 флакона по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл
Хромоген ТМБ - розчин, що містить 3,3', 5,5' - тетраметилбензидин дигідрохлорид. Прозора безбарвна рідина.	1 флакон 1,5 мл	1 флакон 2,5 мл	2 флакона по 3,5 мл	1 флакон 1,5 мл

Стоп-реагент - розчин сірчанної кислоти 0,75 моль/л. Прозора, безбарвна рідина.	1 флакон 25,0 мл	1 флакон 25,0 мл	2 флакона по 25,0 мл або 1 флакон по 50,0 мл	1 флакон 25,0 мл
---	---------------------	---------------------	--	---------------------

Набір упакований в коробку картонну або пакет поліетиленовий, куди вкладається інструкція із застосування.

		Комплек т №1	Комплек т №2	Комплек т №3	Комплек т №4
Додатково набір може бути укомплектований	Кришка до полістиролових 96-лункових планшетів	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.
	Одноразові наконечники	16 шт.	32 шт.	80 шт.	16 шт.
	Пластикова ванночка для рідких реагентів	2 шт.	4 шт.	10 шт.	2 шт.
	Пластикова скріпка для закривання пакета з імуносорбентом або пакет поліетиленовий з замком zip-lock	1 шт.	2 шт.	3 шт.	1 шт.

III. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Достовірність результатів залежить від правильного виконання наступних правил лабораторної практики:

- Постановку ІФА слід проводити в приміщенні з температурою від 18 до 24 °С.
- Не можна використовувати реагенти з вичерпаним терміном придатності.
- Не можна використовувати реагенти з наборів різних серій і змішувати їх в процесі приготування розчинів.
- Перед використанням всі реагенти витримати при температурі від 18 до 24 °С протягом 30 хвилин.
- Робочі розчини готувати обережно, виключаючи будь-яке забруднення.
- Не можна проводити тест у присутності реактивних парів (кислота, луг, альдегіди) або пилу, які можуть вплинути на ферментативну активність кон'югатів.
- Лабораторний посуд повинен бути ретельно промитий або бажаним є матеріали одноразового використання.
- Перед використанням пластикові ванночки для рідких реагентів обполоснути водою дистильованою. Багаторазові ванночки для автоматичних аналізаторів необхідно відразу після роботи обполоснути водою дистильованою. Потім промити 70% розчином етилового спирту і знову обполоснути водою дистильованою.
- Посуд для роботи з субстратною сумішшю (ванночки, флакони і т.д.) у разі повторного використання необхідно відразу після роботи промити 70% розчином етилового спирту, а потім водою дистильованою.
- Імуносорбент допускається зберігати в проміжках між окремими операціями не більше 10 хвилин (не можна допускати висихання лунок планшета).
- Ферментативна реакція особливо чутлива до іонів металів. Не можна допускати контакту металевих предметів з розчинами кон'югатів або субстратів.
- Необхідно використовувати новий наконечник для кожного зразка.
- Промивання лунок - важливий етап в даній процедурі: необхідно дотримуватися рекомендованої кількості циклів промивки і переконатися, що лунки повністю заповнені, не допускати залишку рідини в лунках після промивки. Неправильно проведений етап промивання може призвести до неточних результатів.
- Не можна використовувати одну й ту ж ємність для приготування кон'югату і розчинів.
- Необхідно використовувати тільки валідовані піпетки та обладнання.
- Не можна змінювати процедуру проведення аналізу.
- Не можна піддавати реагенти впливу тепла або світла під час інкубації і зберігання.

IV. ІНСТРУКЦІЇ З БЕЗПЕКИ

- Всі реагенти набору призначені для діагностики "in vitro".

- Сироватки (плазми) крові людини, що використовуються при приготуванні контрольного негативного зразка, контрольного позитивного зразка, контрольного слабопозитивного зразка, були протестовані і визначені нереактивними щодо поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg), антигену р24 ВІЛ-1 і антитіл до гепатиту С і ВІЛ-1, 2.
- При роботі з досліджуваними зразками потрібно поводитися як з потенційно небезпечними матеріалами, так як жоден відомий метод тестування не може гарантувати відсутність інфекційних агентів.
- У приміщенні з імунодіагностичними матеріалами не можна вживати їжу, пити, палити, застосовувати косметику.
- Не можна піпетувати ротом.
- При роботі з будь-яким обладнанням, яке контактує з досліджуваними зразками, потрібно поводитися як з потенційно небезпечними матеріалами.
- При роботі з набором реагентів і досліджуваними зразками необхідно використовувати спец. одяг і одноразові рукавички, ретельно промивати руки після роботи з ними.
- Необхідно уникати розбризкування зразків або розчинів, що містять зразки. При розбризкуванні негайно дезактивувати поверхню 3% розчином хлораміну Б.
- Необхідно уникати контакту субстратного буфера, хромогену, стоп-реагенту зі шкірою та слизовими.
- Після проведення ферментативної реакції необхідно нейтралізувати і/або автоклавувати розчини, відходи або будь-які рідини, що містять біологічні зразки до скидання в стічну трубу. Тверді відходи (використані планшети, наконечники до дозаторів, флакони, лабораторний посуд, одноразові рукавички і т.д.) повинні бути знезаражені зануренням у 6% розчин перекису водню з 0,5% синтетичного миючого засобу (СМС) або в 3% розчин хлораміну Б. Тривалість дезактивації - не менше 1 години. Можливе застосування іншого дозволеного до застосування дез. засобу. Тверді відходи також слід знешкоджувати автоклавуванням протягом години при температурі від 124 до 128 °С під тиском 1,5 кг/см² (0,15 МПа). Рідкі відходи (промивні води) слід знезаражувати додаванням сухого хлораміну Б з розрахунку 30 г/л (тривалість дезактивації - не менше 2 год.) або кип'ятінням протягом 30 хв., або автоклавуванням протягом 1 год. під тиском 1,5 кг/см² (0,15 МПа) при температурі від 124 до 128 °С. Інструменти та обладнання до і після роботи необхідно протирати 2 рази 70% етиловим спиртом.
- Деякі реагенти містять 0,05% Проклін 300. Проклін 300 0,05% - подразнююча речовина. Може викликати алергічну реакцію при контакт з шкірою. При контакт з шкірою промийте область контакту великою кількістю мила і води.

V. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ, ЯКІ НЕ ПОСТАВЛЯЮТЬСЯ З НАБОРОМ РЕАГЕНТІВ

- Вода дистильована.
- Автоматичні або напівавтоматичні, регульовані або попередньо встановлювані одноканальні або багатоканальні піпетки із змінним об'ємом для відбору рідин.
- Одноразові наконечники до піпеток.
- Інкубатор мікропланшетний або термостатований шейкер (42,0 ± 0,5) °С.
- Автоматичний мікропланшетний вошер.
- Градуировані циліндри: 25 мл, 100 мл, 1000 мл.
- Мікропланшетний рідер з можливістю вимірювання оптичної щільності (ОП) при фільтрах 450 нм і 620-680 нм.
- При проведенні аналізу на автоматичному аналізаторі для ІФА на планшетах - автоматичний аналізатор відкритого типу (наприклад «TECAN Freedom EVOlyzer» виробництва фірми «TECAN»).

VI. ВІДБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Збір зразків крові повинен проводитися відповідно до поточної практики. В якості досліджуваних зразків можуть бути використані сироватка (плазма) крові людини або препарати крові. Сироватку від еритроцитів або плазму від згустку слід відокремити якомога швидше, щоб уникнути гемолізу. Гемоліз може вплинути на робочі характеристики тесту. Зразки, що містять видимі частки, слід освітлити центрифугуванням до проведення тесту. Зважені частки фібрину і агрегати можуть привести до хибнопозитивних результатів. При аналізі рідких препаратів крові, розчини альбуміну попередньо розвести в 2 рази робочим розчином ПР, комплексні імуноглобулінові препарати (КІП) розвести в 4 рази робочим розчином ПР, інші рідкі препарати крові аналізувати нерозведеними; ліофільно висушені препарати крові перед дослідженням розвести відповідно до інструкції щодо застосування даного препарату. Зразки можна зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 3 діб, допустимо тривале зберігання в замороженому стані при температурі мінус 20 °С на протязі 3 місяців. Сироватку (плазму) слід

швидко розморозувати протягом декількох хвилин при температурі 40 °С на водяній бані. Не можна використовувати сироватку (плазму), заморожену і розморозжену більше одного разу. Не можна використовувати сироватку (плазму) забруднену, з гемолізом, або гіперліпідемією або консервовану азидом натрію.

VII. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Реагенти, готові до застосування:

- К- - контрольний негативний зразок
- К+1 - Контрольний позитивний зразок
- К+2 - контрольний слабопозитивний зразок, рідкий
- РРК - розчин для розведення кон'югату
- АНТИ-НВс-ПЛЮС (нейтралізуючий реагент), рідкий
- АНТИ-НВс -МІНУС (контрольний реагент), рідкий
- Стоп-реагент

2. Реагенти, що потребують попереднього приготування

Імуносорбент. Кожен планшет, що складається з 12 смужок, упакований в фольгований пакет. Розкрити пакет і витягнути планшет. Взяти потрібну кількість смужок.

Пакет з невикористаними смужками ретельно герметизувати (без видалення осушувача!). Для цього помістити розкритий пакет з імуносорбентом в поліетиленовий пакет із замком zip-lock або край пакета з імуносорбентом згорнути 2-3 рази і закріпити, надівши зверху скріпку для фольгованого пакета.

К+2 - контрольний слабопозитивний зразок. Вміст флакона з ліофілізованим К+2 розчинити у воді дистильованій в об'ємі, зазначеному на етикетці флакона, обережно перемішати і витримати до використання 5-10 хв. Регідратований реагент К+2 після розчинення повинен являти собою опалесцючу рідину світло-жовтого кольору. Титрування К+2 і розчинення його в інших об'ємах води дистильованої не проводити! Розчин стабільний не більше 6 годин при температурі від 18 до 24 °С. При комплектації набору рідким реагентом К+2 готовий до застосування.

Робочий промивний розчин (ПР). Вміст флакона з концентратом (x25) розчину для промивання ретельно перемішати. Для приготування робочого розчину для промивання необхідний обсяг концентрату (x 25) розчину для промивання розвести відповідним обсягом води дистильованої (див. табл. № 2 і 3). Отриманий розчин ретельно перемішати. Приготований робочий промивний розчин стабільний протягом 3 діб при зберіганні при температурі від 2 до 8 °С.

Робочий розчин кон'югату. Для приготування робочого розчину кон'югату необхідний обсяг концентрату (x11) Кон'югати розвести відповідним обсягом РРК (див. табл. № 2 і 3). Отриманий розчин обережно перемішати, не допускаючи спінювання (інтенсивне перемішування не застосовувати!). Робочий розчин кон'югату стабільний не більше 12 год. у захищеному від світла місці при температурі від 18 до 24 °С.

Розчин нейтралізуючого реагенту АНТИ-НВс-ПЛЮС. Вміст флакона (або ампули) з ліофілізованим АНТИ-НВс-ПЛЮС розчинити в об'ємі води дистильованої, зазначеному на етикетці флакона. Термін придатності приготовленого розчину - не більше 1 міс. при температурі від 2 до 8 °С. При дробовому використанні набору протягом більш тривалого терміну приготовлений розчин розділити на частини і невикористані аликвоти зберігати під щільно закритою пробкою в замороженому стані впродовж терміну придатності тест-системи при температурі не вище мінус 10 °С (не допускається заморожування і відтавання реагенту більше 1 разу).

Розчин контрольного реагенту АНТИ-НВс-МІНУС. Вміст флакона (або ампули) з ліофілізованим АНТИ-НВс-МІНУС розчинити в об'ємі води дистильованої, зазначеному на етикетці флакона. Термін придатності приготовленого розчину - не більше 1 міс. при температурі від 2 до 8 °С. При дробовому використанні набору протягом більш тривалого терміну приготовлений розчин розділити на частини і невикористані аликвоти зберігати під щільно закритою пробкою в замороженому стані впродовж терміну придатності тест-системи при температурі не вище мінус 10 °С (не допускається заморожування і відтавання реагенту більше 1 разу).

При комплектації набору рідкими компонентами нейтралізуючий і контрольний реагенти готові до застосування.

Субстратна суміш (СС). Готувати перед використанням. Необхідний обсяг ТМБ розвести відповідним обсягом СБ (див. табл. № 2 і 3), ретельно перемішати до повного розчинення. Припустимо зберігання СС не більше 10 год. у захищеному від світла місці при температурі від 18 до 24 °С в хімічно чистих флаконах або спеціальній ємності, призначеної для постановки ІФА на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу.

Субстратна суміш повинна бути безбарвною!

3. Зберігання невикористаних реагентів

Після відкриття флаконів, реагенти, що залишилися невикористаними, допускається зберігати: ПР (концентрат x 25), К+1, К+2 (рідкий), К-, РРК, кон'югат (концентрат x11), СБ, ТМБ, стоп-реагент, АНТИ-НВс-ПЛЮС (рідкий), АНТИ-НВс-МІНУС (рідкий) - у флаконах, закритих гвинтовими кришками, протягом терміну придатності тест-системи при температурі від 2 до 8 °С. Імуносорбент після розкриття пакета допускається зберігати протягом 1 міс. при температурі від 2 до 8 °С.

VIII. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Необхідні об'єми реагентів залежно від кількості використовуваних смужок або планшета представлені в таблиці 2:

Таблиця 2

Розхід реагентів набору в залежності від кількості використовуваних смужок при ручній постановці ІФА

Кількість використуваних смужок	Робочий промивний розчин		Робочий розчин кон'югата		СС	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистильована (мл)	Кон'югат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
1	3,0	72,0	0,05	0,5	ОД	2,0
2	6,0	144,0	0,10	1,0	0,2	4,0
3	9,0	216,0	0,15	1,5	0,3	6,0
4	12,0	288,0	0,20	2,0	0,4	8,0
5	15,0	360,0	0,25	2,5	0,5	10,0
6	18,0	432,0	0,30	3,0	0,6	12,0
7	21,0	504,0	0,35	3,5	0,7	14,0
8	24,0	576,0	0,40	4,0	0,8	16,0
9	27,0	648,0	0,45	4,5	0,9	18,0
10	30,0	720,0	0,50	5,0	1,0	20,0
11	33,0	792,0	0,55	5,5	1,1	22,0
12 (цілий планшет)	40,0	960,0	0,70	7,0	1,2	24,0

Проведення ІФА

1. Перед використанням імуносорбент промити 3 рази робочим ПР: обережно внести робочий ПР в лунки планшета за допомогою промивного пристрою до країв лунок (не менше 380 мкл в лунку), витримати 40 с, потім видалити промивний розчин в ємність з дезінфікуючим розчином. Рекомендується використовувати автоматичний мікропланшетний вошер. Недостатня промивка може несприятливо вплинути на точність аналізу.

2. При одночасній постановці на цілому планшеті: в 4 лунки імуносорбента піпеткою змінного об'єму внести по 150 мкл К-, в 1 лунку - 150 мкл К+1, в 3 лунки - по 150 мкл К+2 для контролю чутливості тест-системи.

При дробовій постановці на смужках планшета: в 2 лунки імуносорбенту піпеткою змінного об'єму внести по 150 мкл К-, в 1 лунку - 150 мкл К+1, в 2 лунки - по 150 мкл К+2 для контролю чутливості тест-системи (чутливість тест-системи визначають тільки в одному з 12-ти стрипів імуносорбенту);

В інші лунки внести по 150 мкл досліджуваних зразків. Далі в усі використані лунки додати по 50 мкл робочого розчину кон'югату. При додаванні кон'югату не слід допускати випадкового занесення зразка з одного стрипа (ряду лунок) в інший через наконечники. Імовірність такого занесення може бути усунена зміною послідовності внесення в лунки зразків і кон'югату - перед внесенням зразків в лунки закопують кон'югат. Вміст лунок ретельно перемішати обережним постукуванням по краю планшета, після чого покритий кришкою планшет витримати в термостаті протягом 2 год. при температурі (42±0,5) °С в умовах вологої камери*. При наявності термостатованого шейкера планшет без кришки витримати 1 год 15 хв. на шейкері при швидкості 500 об/хв. і температурі (42±0,5) °С.

3. Вміст лунок видалити в ємність для збору інфікованого матеріалу і планшет промити 5 разів робочим ПР, як зазначено в п.1. **

*В якості вологої камери може бути використаний поліетиленовий пакет з вкладеною в нього ватю (марлею) або фільтрувальним папером, змоченим водою.

**Для виключення неспецифічного фарбування розчину в лунках планшета з метою видалення залишків кон'югату з поверхні імуносорбенту, після промивання ПР допускається ополіскування імуносорбенту дистильованою водою (заливаючи весь планшет і витрушуючи над ємністю) з подальшим видаленням залишків вологи шляхом постукування по складеному в кілька шарів фільтрувальному паперу. Дану операцію проводити з використанням засобів індивідуального захисту (гумових рукавичок, захисних окулярів або екрана), використану фільтрувальний папір помістити в ємність з дезінфікуючим розчином.

4. У всі лунки планшета внести по 200 мкл СС і витримати протягом 25-30 хв. в захищеному від світла місці при температурі від 18 до 24 °С.

- Реакцію зупинити додаванням в усі лунки по 50 мкл стоп-реагенту і через 2-3 хв. провести облік результатів.
- Проведення аналізу в автоматичному режимі на автоматичному аналізаторі типу «TECAN Freedom EVOlyzer» виробництва фірми «TECAN», Швейцарія (можлива постановка на інших моделях ІФА-аналізаторів відкритого типу).

Таблиця 3

Розхід реагентів тест-системи на один планшет при постановці ІФА на автоматичних аналізаторах для імуноферментного аналізу відкритого типу

Кількість використаних смужок	Робочий промивний розчин		Робочий розчин кон'югата		СС	
	ПР (конц. x25) (мл)	Вода дистильована (мл)	Кон'югат (конц. x 11) (мл)	РРК (мл)	ТМБ (мл)	СБ (мл)
12 (цілий планшет)	40,0	960,0	0,70	7,0	1,2	24,0

- Задати програму проведення ІФА і включити аналізатор.
- Приготований робочий промивний розчин залити в призначену для нього ємність (що входить в комплект до ІФА-аналізатору), інші робочі розчини та реагенти помістити в спеціальні контейнери або ємності. Флакони з контрольними зразками К+1, К+2 і К-, і флакони або пробірки з досліджуваними зразками в обсязі не менше 500 мкл встановити у відповідні штативи аналізатора. У аналізатор помістити необхідну кількість планшетів. Далі постановку проводити відповідно з інструкцією із застосування ІФА-аналізатора і програмою проведення ІФА.
- По закінченні аналізу прилад видає протокол за результатами дослідження, в якому дається характеристика кожного досліджуваного зразка і контрольних зразків К+1, К+2 і К-.
- Результати аналізу враховувати, якщо значення ОЩ в лунці з контрольним позитивним зразком (К+1) не менше 0,6, а середнє значення в лунках з контрольним негативним зразком (К-) не більше 0,12. Далі облік результатів проводити аналогічно розділу ІХ.

ІХ. РЕЗУЛЬТАТИ

Облік результатів провести спектрофотометрично при двох довжинах хвиль - 450 нм і при референс-довжині хвилі в діапазоні від 620 до 680 нм з налаштуванням приладу по «повітрю». Припустимо облік результатів при одній довжині хвилі - 450 нм. Реакції слід враховувати, якщо значення ОЩ в лунках з К+1 не менше 0,6, а середнє значення ОЩ в лунках з К- не більше 0,12. Якщо одне із значень ОЩ К- виходить за цю межу, його слід виключити з розрахунку середнього значення. Якщо виключенню підлягають більше одного значення ОЩ К-, аналіз слід повторити. Позитивними вважають зразки зі значеннями ОЩ, рівними або перевищують ОЩ критичне (ОЩ крит.). ОЩ крит. розраховують за формулою:

$$\text{ОЩ крит.} = \text{ОЩ К-}_{\text{CP}} + \text{А},$$

де А - коефіцієнт, що визначається методом статистичної обробки результатів постановки ІФА на підприємстві-виробнику, величину якого вказують в інструкції по застосуванню, що вкладається в коробку з набором і в паспорті на серію даного препарату*.

* Для набору серії № величина коефіцієнта А Контрольний слабопозитивний зразок (К+2), що містить НВsAg в концентрації 0,150 +0,05 МОд/мл, повинен давати позитивну реакцію.

Всі зразки, що дають позитивну реакцію, досліджують в підтверджуючому тесті з наборами «ІФА-НbsAg» (ТУ № 9398-006-05941003-2008) або «ДС-ІФА-НbsAg» (комплект № 4), виготовленими в ТОВ «Науково-виробниче об'єднання «Діагностичні системи», або іншими підтверджуючими тестами, заснованими на реакції нейтралізації. Дослідження проводять відповідно до інструкції по застосуванню набору.

Х. ПРОЦЕДУРА ВИКОНАННЯ ПІДТВЕРДЖУЮЧОГО ТЕСТУ

Необхідні обсяги реагентів залежно від кількості використаних стрипів або планшета представлені в таблиці 2 (розділ VIII. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ).

Перед початком роботи залежно від числа зразків, які підлягають підтвердженню, визначають необхідну кількість стрипів імуносорбенту, при цьому слід врахувати, що для підтвердження одного зразка необхідні 2 лунки. При виконанні ІФА можливо використовувати мінімум 2 смужки, одна з яких (8 лунок) необхідна для постановки контрольних зразків, а інша (8 лунок) - для підтвердження присутності НВsAg в 4-х досліджуваних зразках.

Проведення Підтверджуючого тесту.

- Перед використанням імуносорбент промити 3 рази робочим ПР: обережно внести робочий ПР в лунки планшета за

допомогою промивного пристрою до країв лунок (не менше 380 мкл в лунку), витримати 40 сек., потім видалити промивний розчин в ємність з дезінфікуючим розчином. Рекомендується використовувати автоматичний мікропланшетний вошер. Недостатня промивка може несприятливо вплинути на точність аналізу.

- В 3 лунки імуносорбенту піпеткою змінного об'єму внести дозатором по 150 мкл К-, в 1 лунку - 150 мкл К+1. ОЩ лунок з негативним контрольним зразком використовують для підрахунку середнього значення ОЩ К- (К-_{CP}) і значення ОЩ критичного (ОЩ крит.). У ці лунки контрольний і нейтралізуючий реагенти не вносити.

Для контролю підтверджуючого тесту (Див. схему внесення реагентів) додатково в 2 лунки імуносорбенту внести по 150 мкл К+1 і в 2 лунки по 150 мкл К-.

В інші лунки внести по 150 мкл зразків, які підлягають підтвердженню (кожен зразок внести в 2 лунки).

Потім у перші лунки з контрольними зразками (К+1 і К-) і зразками, які аналізуються, додати по 25 мкл контрольного реагенту - АНТИ-НВs-МІНУС, в другі - по 25 мкл нейтралізуючого реагенту - АНТИ-НВs-ПЛЮС.

Таблиця 4

Схема внесення реагентів

	1	2
A	К- 150 мкл	Зразок № 1 150 мкл, АНТИ-НВs-МІНУС 25 мкл
B	К- 150 мкл	Зразок № 1 150 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
C	К- 150 мкл	Зразок № 2 150 мкл, АНТИ-НВs-МІНУС 25 мкл
D	К+1 150 мкл	Зразок № 2 150 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
E	К- 150 мкл, АНТИ-НВs- МІНУС 25 мкл	Зразок № 3 150 мкл, АНТИ-НВs-МІНУС 25 мкл
F	К- 150 мкл, АНТИ-НВs- ПЛЮС 25 мкл	Зразок № 3 150 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл
G	К+1 150 мкл, АНТИ-НВs- МІНУС 25 мкл	Зразок № 4 150 мкл, АНТИ-НВs-МІНУС 25 мкл
H	К+1 150 мкл, АНТИ-НВs- ПЛЮС 25 мкл	Зразок № 4 150 мкл, АНТИ-НВs-ПЛЮС 25 мкл

Далі в усі використані лунки (у тому числі і лунки з контрольними зразками без підтверджуючих реагентів) додати по 50 мкл робочого розчину кон'югату. При додаванні кон'югату не слід допускати випадкового занесення зразка з одного стрипа (ряду лунок) в інший через наконечники. Імовірність такого занесення може бути усунена зміною послідовності внесення в лунки зразків і кон'югату - перед внесенням зразків в лунки закапати кон'югат, потім додати контрольний реагент - АНТИ-НВs-МІНУС, і нейтралізуючий реагент - АНТИ-НВs-ПЛЮС, далі внести контрольні зразки і зразки, які підлягають підтвердженню. Вміст лунок ретельно перемішати обережним постукуванням по краю планшета, після чого покритий кришкою планшет витримати в термостаті протягом 2 год. при температурі (42,0±0,5) °С в умовах вологої камери*. При наявності термостатованого шейкера планшет без кришки витримати 1 год. 15 хв. на шейкері при швидкості 500 об/хв. і температурі (42+0,5) °С.

- Вміст лунок видалити в ємність для збору інфікованого матеріалу і планшет промити 5 разів робочим ПР, як зазначено в п. 1.**
- У всі лунки імуносорбенту внести по 200 мкл СС і витримати протягом 25-30 хв. в захищеному від світла місці при температурі від 18 до 24 °С.
- Реакцію зупинити додаванням в усі лунки по 50 мкл стоп-реагенту і через 2-3 хв. провести облік результатів.
*В якості вологої камери може бути використаний поліетиленовий пакет з вкладеною в нього ватою (марлею) або фільтрувальним папером, змоченим водою.
**Для виключення неспецифічного фарбування розчину в лунках планшета, з метою видалення залишків кон'югата з поверхні імуносорбенту після промивки ПР допускається ополіскування імуносорбенту дистильованою водою (заливаючи весь планшет і витрушуючи над ємністю) з подальшим видаленням залишків вологи шляхом постукування по складеному в кілька шарів фільтрувальному паперу. Дану операцію проводити з використанням засобів індивідуального захисту (гумових рукавичок, захисних окулярів або екрана), використану фільтрувальний папір помістити в ємність з дезінфікуючим розчином.
- Проведення аналізу в автоматичному режимі на автоматичному аналізаторі типу «TECAN Freedom EVOlyzer» виробництва фірми «TECAN», Швейцарія (можлива постановка на інших моделях ІФА-аналізаторів відкритого типу). Необхідні обсяги реагентів представлені в таблиці 3

(розділ VIII. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ). Постановку проводити аналогічно п. 6 розділу VIII. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ.

XI. РЕЗУЛЬТАТИ ПІДТВЕРДЖУЮЧОГО ТЕСТУ

Оцінку валідності проведення тесту по оптичній щільності контрольного негативного зразка, контрольного позитивного зразка та контрольного слабопозитивного зразка проводити згідно з пунктом IX. Значення ОЩ в лунках з К- після внесення АНТИ-НВs-МІНУС і АНТИ-НВs -ПЛЮС повинні бути нижче ОЩ_{КРИТ}.

Присутність поверхневого антигену гепатиту В (НВsAg) в досліджуваних зразках і К +1 визначається показником нейтралізації - це співвідношення значень оптичної щільності зразка після нейтралізації і значень оптичної щільності зразка до нейтралізації. Показник нейтралізації (%) визначається за формулою:

$$(ОЩ_K - ОПн) / (ОЩ_K - ОЩ_{K-CP}) \times 100 \%$$

де ОЩ_к - оптична щільність зразка після внесення АНТИ-НВs-МІНУС;
ОЩ_н - оптична щільність зразка після внесення АНТИ-НВs-ПЛЮС;
ОЩ_{к-ср} - середнє значення оптичної щільності контрольного негативного зразка.

Зразок вважається позитивним якщо :

1. ОЩ_к ≥ ОЩ_{кр}.

2. Показник нейтралізації ≥ 50 %.

Показник нейтралізації ОЩ_{к+1} повинен бути ≥ 50 %.

Зразок з ОЩ ≥ 1,0, що не піддався нейтралізації, слід розвести в 25 разів робочим розчином для промивання і повторити тестування. Якщо після розведення у 25 разів зберігаються високі значення ОЩ і зразок не піддається нейтралізації, то рекомендується розвести вихідний зразок в 50 разів і більше (100 , 200 і т.д.) і знову провести аналіз . Якщо зразок , розведений у 50 і більше разів, піддається нейтралізації більш ніж на 50 % , то його слід вважати позитивним. Якщо показник нейтралізації менше 50% вважати зразок негативним.

XII. ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Термін придатності - 24 міс. Набір з вичерпаним терміном придатності використанню не підлягає.

Зберігання - в сухому, захищеному від світла місці при температурі від 2 до 8 °С.

Транспортування - при температурі від 2 до 8 °С. Припустимо транспортування від 9 до 20 °С не більше 10 діб. Заморожування не допускається.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул.Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com

