

Затверджено
Заступник головного державного санітарного
лікаря України
21 квітня 2005 р.

ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

DIA-HBsAg

тест-система імуноферментна
для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg)

Набір T1-12

T-2007

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для аналізу сироватки або плазми крові людини на наявність поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) методом імуноферментного аналізу.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані моноклональні антитіла до поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg); *концентрат кон'югату* – моноклональні антитіла до HBsAg, кон'юговані з пероксидазою хрому; *позитивний контроль* – інактивована сироватка крові людини, яка містить HBsAg; *негативний контроль* – сироватка крові людини, яка не містить поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), а також антитіла до ВІЛ, вірусу гепатиту С і Тгеропета pallidum; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчин для розведення кон'югату* – фосфатно-сольовий буфер, що містить детергент, блок-компоненти, барвник і консерванти; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромоген* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 12 стрипів по 8 лунок; *концентрат кон'югату* – блакитна з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контроль* – світло-жовті з незначною опалесценцією рідини; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцюча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення кон'югату* – червона опалесцюча рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 96 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшета постріпово на 12 постановок імуноферментного аналізу (12×8).

Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-HBsAg базується на методі твердофазного ІФА „сендвіч”-варіанту і представляє собою однокрокову процедуру з одночасною інкубацією сироваток і кон'югату.

При внесенні в лунки зразків досліджуваних сироваток та кон'югату, HBsAg у випадку його наявності, зв'язується як зі специфічними антитілами на твердій фазі, так і з антитілами кон'югату, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин провняника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (при довжині хвилі 450 нм), яка пропорційна концентрації HBsAg у зразках сироваток або плазми крові.

СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	1 планшет (12×8)
2	Концентрат кон'югату (11х)	1 амп. × 1,0 мл
3	Позитивний контроль	2 амп. × 1,5 мл
4	Негативний контроль	3 амп. × 1,7 мл
5	Концентрат розчину для промивання (31х)	2 фл. × 25 мл
6	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. × 9 мл
7	Субстратний буфер	1 фл. × 8 мл
8	Розчин ТМБ	1 фл. × 8 мл
9	Стоп-реагент	1 фл. × 15 мл
10	Клейка плівка	3 шт.

СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

Необхідні застереження

Заходи безпеки при застосуванні набору:

- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
- працювати в гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- всі стінні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
- всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°C;
- інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

Вимоги до промивання планшету:

- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшета рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°C не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°C) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

Проведення аналізу

1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 8 лунок)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°C протягом 30 хвилин.

1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 4 мл розчину і розводять в 120 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогривають перед використанням при 35-37°C до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 10 діб.

1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 0,6 мл розчину для розведення кон'югату та додають 60 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

1.3 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 0,5 мл хромогену ТМБ і додають 0,5 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

2 Проведення аналізу

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
- Звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку.
Невикористані стрипи необхідно щільно закрити в пакеті та використати протягом одного місяця. Невикористані стрипи зберігають при температурі 2-8 °C.
- В лунки вносять по 100 мкл зразків досліджуваних сироваток, залишивши вільними 5 лунок першого ряду (лунки для контролів).
- В дві лунки (A1-B1) вносять по 100 мкл позитивного контролю, а в три інші (C1-E1) – по 100 мкл негативного контролю.
- Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.
- Витримують планшет при 18-25 °C протягом 10 хвилин та додають в кожну лунку поверх досліджуваних та контрольних зразків сироваток по 50 мкл розчину кон'югату. По закінченні внесення кон'югату встановлюють планшет на автоматичний потрушувач та перемішують вміст лунок (при малій амплітуді потрушування) протягом 15-20 сек.
- Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 42 °C протягом 2 годин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки вісім разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.3.
- Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °C в темному місці протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не більше як через 5 хвилин після зупинення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двоххвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).
ОГ можна визначати в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

- Розраховують середнє значення оптичної густини для лунок негативного контролю (ОГсер К-) та позитивного контролю (ОГсер К+).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К- не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), а ОГсер К+ не нижче 0,6 ОО.
- Якщо значення ОГсер К- більше ніж 0,010 ОО, то всі значення ОГ негативного контролю мають не більше, ніж в два рази перевищувати ОГсер К-. У випадку, якщо одне зі значень ОГ негативного контролю більше ніж в два рази перевищує значення ОГсер К-, його відкидають і ОГсер К- розраховують за рештою значень ОГ негативного контролю.
- Якщо значення ОГсер К- менше або дорівнює 0,010 ОО, то всі значення ОГ негативного контролю мають знаходитись в інтервалі від - 0,010 до + 0,010 від значення ОГсер К-. У випадку якщо одне зі значень ОГ негативного контролю не відповідає цій умові, його відкидають і ОГсер К- розраховують за рештою значень ОГ негативного контролю.
- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,06** до значення ОГсер К-.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка менше ГЗ.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ.
- Зразки, що дали позитивний результат, необхідно досліджувати повторно не менш ніж в двох лунках тест-системи:
 - зразки позитивні в одній або більше лунках слід вважати позитивними;
 - зразки негативні в двох або більше лунках слід вважати негативними.

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C. Заморожувати набір не дозволяється.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 7 місяців.

ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатощарової та комбінованої плівки; пакет термозапаляний.
- Кон'югат, позитивний контроль, негативний контроль розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Розчини крім розчину ТМБ розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщений в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diapr.kiev.ua.

Рекламації на якість наборів надсилайте до ДП “Центр імунологічних препаратів” за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.