

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Генеральний директор
ТОВ «Бест Діагностик»
_____ О.В. Шкурдай
«__» _____ 2012 р.

ІНСТРУКЦІЯ з використання набору реагентів

HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ

Набір реагентів для імуноферментного виявлення та підтвердження наявності HBsAg

1. Призначення

Набір реагентів «HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ» призначений для підтвердження наявності HBsAg в зразках сироватки або плазми крові. Позитивний результат, отриманий хоч б в одній постановці «HBsAg-скрин-БЕСТ», має бути підтверджений нейтралізацією специфічними антитілами в наборі «HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ».

2. Аналітична чутливість

Мінімальна концентрація HBsAg, що підтверджується за допомогою набору, складає за стандартним зразком HBsAg 0,05 МЕ/МЛ

3. Принцип аналізу

«HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ» є набором для підтвердження присутності HBsAg методом конкурентного імуноферментного аналізу (ІФА), заснованого на принципі нейтралізації HBsAg специфічними антитілами.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

Розчин підтверджуючого агенту (РПА), – 1 мікропробірка, що містить концентрований розчин підтверджуючого агенту (РПА), що містить нейтралізуючі моноклональні антитіла до HBsAg, – 1 фл.; (зелений).

Розчин для розведення зразка (РРЗ) – буферний розчин, що містить екстракт молока – 1 фл., з детергентом та консервантами (фіолетовий).

Бланк внесення проб – 1.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

Імуноферментна тест-система «HBsAg-скрин-БЕСТ», 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. Застереження та техніка безпеки

При роботі з досліджуваними 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.

6. Зберігання

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

7. Досліджувальні зразки

Зразки до дослідження можна зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 С і 3 міс при температурі мінус 20 С або нижчою. Допускається тільки одноразове заморожування-розморожування зразків. Розморожені зразки перед дослідженням ретельно перемішати.

Не допускається використання для дослідження зразків з підвищеним вмістом ліпідів і (або) з ознаками гемолізу, і (або) з видимим мікробним проростанням.

Зразки, що містять осад, перед аналізом відцентрифугувати протягом 10-15 хв при 2500-3000 об / хв.

8. Розведення зразків та підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

Комплект використовується разом з імуоферментною тест-системою «HBsAg-скрин-БЕСТ», тому слід підготувати ІФА-планшет, розчин для промивання та розчин кон'югату згідно пунктів інструкції до тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ».

8.1. Розведення зразків та контролів

Сироватки з високою концентрацією поверхневого антигену вірусу гепатиту В >10 мкг/мл (оптична густина в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ» - вище 3,0 оптичних одиниць) можуть не нейтралізуватись в нерозведеному вигляді. Такі сироватки слід досліджувати цільними та розведеними в 100 разів за допомогою РРЗ. Розведення сироваток 1:100 готують наступним чином: до 990 мкл розчину для розведення сироваток додають 10 мкл сироватки, яка має високе значення ОГ в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ».

Процедуру розведення зразків проводять безпосередньо перед аналізом.

8.2. Приготовування розчину нейтралізаційного агенту

Розчин нейтралізаційного агенту готується на основі розчину кон'югату у робочому розведенні з тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ».

Для приготування розчину нейтралізаційного агенту розведіть концентрат нейтралізаційного агенту (зелений) 1:11 розчином кон'югату у робочому розведенні (фіолетовий), та перемішайте.

Наприклад: для дослідження 8 зразків, позитивних на HBsAg у тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ», достатньо приготувати 1 мл розчину кон'югату, відібрати 0,5 мл цього розчину та додати до нього 50 мкл нейтралізаційного агенту. Обережно перемішати розчин не допускаючи піноутворення.

Розчин кон'югату з нейтралізаційним агентом має бути використаний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу, вставити їх в рамку ІФА-планшету. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити Бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно інструкції до тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ».

9.4. Приготувати розчин кон'югату згідно інструкції до тест-системи «HBsAg-скрин-БЕСТ».

9.5. Приготувати розчин кон'югату та нейтралізаційного агенту згідно пункту 8.2.

9.6. При потребі приготувати попереднє розведення 1:100 досліджуваних сироваток з високим вмістом HBsAg згідно пункту 8.1.

9.7. Контрольні зразки та досліджувані сироватки цільні або в розведенні 1:100 внести по 100 мкл в двох повторях (для прямого та конкурентного ІФА) наступним чином: в лунки А1, А2 – позитивний контроль, в лунки В1, В2, С1, С2 – негативний контроль, в лунки D1, D2 та інші лунки – досліджувані зразки.

9.8. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в непарні стрипи (А1, В1, С1 і т.д.) по 50 мкл розчину кон'югату для проведення прямого ІФА, в парні стрипи (А2, В2, С2 і т.д.) по 50 мкл розчину кон'югату з нейтралізаційним агентом для проведення конкурентного ІФА. Для запобігання кросконтамінації зразків, розчини кон'югату та нейтралізаційного агенту слід вносити не торкаючись сироваток в лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш в лунках.

9.9. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 хвилин при температурі 42°C.

9.10. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки шість разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще п'ять разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.11. Внести в лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату. Розчин ТМБ-субстрату має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Для внесення розчину ТМБ використовувати лише нові наконечники.

9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі (18-25°C).

9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.14. Виміряти на рідері оптичну густина в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати % нейтралізації для лунок з позитивним контролем наступним чином:

$$\% \text{ нейтралізації } K+ = \frac{OG_{K+\text{прямого ІФА}} - OG_{K+\text{конкурентного ІФА}}}{OG_{K+\text{прямого ІФА}}} \times 100\%$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю в прямому ІФА не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ всіх лунок негативного контролю в прямому чи конкурентному ІФА не вище 0,1 ОО,
- % нейтралізації для позитивного контролю складає не менше 50%.

10.2. Облік результатів аналізу.

Розрахувати середнє значення негативного контролю в прямому ІФА

$$OGK\text{-}_{\text{середнє}} = (OG_{K-1} + OG_{K-2})/2$$

Рівень граничного значення (ГЗ) розрахувати, додаючи до середнього значення негативного контролю в прямому ІФА величину 0,070, тобто

~~ГЗ = ОГК-_{середнє} + 0,070~~

Розрахувати % нейтралізації для досліджуваних зразків наступним чином:

~~$$\% \text{ нейтралізації } K+ = \frac{OG_{K+\text{прямого ІФА}} - OG_{K+\text{конкурентного ІФА}}}{OG_{K+\text{прямого ІФА}}} \times 100\%$$~~

10.3. Інтерпретація результатів.

Досліджувані сироватки із значенням ОГ в прямому ІФА нижче граничного значення є **негативними**.

Досліджувані сироватки (цільні або в розведенні 1:100) із значенням ОГ в прямому ІФА більше величини граничного значення, та % нейтралізації 50 і більше є **позитивними**.

Зразки, які при тестуванні цільними та розведеними в 100 разів мають ОГ в прямому ІФА більше 3,0 та не нейтралізувались, слід також дослідити в розведенні 1:1000 та провести інтерпретацію результатів, як вказано вище.

Якщо значення ОГ досліджуваних сироваток (цільних або в розведенні 1:100) в прямому ІФА більше граничного значення, а відсоток нейтралізації становить менше 50, то це вказує на неспецифічну реакцію. Такі зразки слід вважати **негативними**.

Тобто:

Значення оптичної густини	% нейтралізації	Результат
$OG_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$\geq 50\%$	позитивний
$3,000 > OG_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$< 50\%$	негативний
$OG_{\text{зразка в прямому ІФА}} < \text{ГЗ}$	будь-який	негативний

УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І КОРИСТАННЯ 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, звертається 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 у разі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

Схема проведення аналізу в тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ»

з використанням комплекту реагентів «HBsAg-скрин-підтверджуючий-БЕСТ»

приготувати	розчин для промивання планшету, розвести концентрат (20x) очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19) Наприклад, 5 мл розчину + 95 мл води
заповнити	бланк внесення проб для аналізу
розвести	При потребі розвести досліджувані зразки 1:100 (якщо ОГ зразків у тест-системі «HBsAg-скрин-БЕСТ» вище 3,000 ОО) розчином для розведення зразків
розвести	концентрат кон'югату (11x) (синій) розчином для розведення кон'югату (рожевий) 1:11. Наприклад, 100 мкл кон'югату + 1000 мкл розчину (розчин забарвлюється у фіолетовий колір)
приготувати	розчин нейтралізаційного компоненту (11x): розвести нейтралізаційний агент (11x) (зелений) розчином кон'югату у робочому розведенні (фіолетовий). Наприклад, 50 мкл нейтралізаційного агенту + 500 мкл розчину кон'югату
внести	по 100 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки: A1, A2 – позитивний контроль, B1, B2, C1, C2 – негативний контроль, D1, D2 – та решта лунок в тому ж порядку – цільні досліджувані зразки або в розведенні 1:100.
внести	Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки непарних стрипів по 50 мкл розчину кон'югату
внести	Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки парних стрипів по 50 мкл розчину нейтралізаційного агенту
інкубація	Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 120 хв. при 42°C
промивати	лунки 6 разів
внести	В лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату
інкубація	планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)
внести	В лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту
Виміряти	оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм
Розрахувати	граничне значення (ГЗ) за формулою $G = \frac{P}{Z} \times 100$
Розрахувати	% нейтралізації для досліджуваних зразків за формулою: $\% N = \frac{O_{zi} - O_{zn}}{O_{zn}} \times 100$
реєстрація	на спектрофотометрі при 450 нм/620 нм або 450 нм.

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення оптичної густини	% нейтралізації	Результат
ОГ зразка в прямому ІФА \geq ГЗ	\geq 50%	позитивний
3,000 > ОГ зразка в прямому ІФА \geq ГЗ	< 50%	негативний
ОГ зразка в прямому ІФА < ГЗ	будь-який	негативний