

ІНСТРУКЦІЯ

з використання набору реагентів

HBsAg-підтверджуючий-БЕСТ

Набір реагентів для імуноферментного підтвердження присутності та кількісного визначення
HBs-антигену вірусу гепатиту В в сироватці (плазмі) крові

ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір реагентів «HBsAg-підтверджуючий-БЕСТ» (далі по тексті - набір) призначений для кількісного визначення HBs-антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в сироватці / плазмі крові методом твердофазного імуноферментного аналізу. Набір розрахований на проведення аналізу 30 досліджуваних зразків, 5 калібрувальних і 1 контрольного зразка.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРУ

2.1. Принцип методу

Метод визначення являє собою двустадійність твердофазного імуноферментного аналізу.

На першій стадії аналізу досліджувані зразки інкубують в лунках планшета з іммобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg. Наявний в зразках HBsAg зв'язується з моноклональними антитілами, формуючи комплекс «антитіло-антиген».

На другій стадії зв'язавшись HBsAg взаємодіє з біотильованими поліклонполіклональними антитілами до HBsAg, потім стрептавидин, мічений пероксидазою хрому, зв'язується з біотинілірованими поліклональними антитілами до HBsAg. Комплекс «антитіло - антиген - кон'югат» виявляють кольоровий реакцією з використанням субстрату пероксидази - перекису водню і хромогену - тетраметилбензидіна. Інтенсивність фарбування пропорційна концентрації HBsAg в аналізованих зразках.

Концентрацію HBsAg в аналізованих зразках визначають за каліброване графіком залежності оптичної щільності від змісту HBsAg у калібрувальних зразках.

2.2. Склад набору

- планшет розбірний з іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок моноклональними антитілами до HBsAg, готовий для використання - 1 шт.;
- калібрувальні зразки, що містять HBsAg: 0; 0,05; 2, 5, 10 МЕ/мл - 5 фл. по 1,3 мл;
- контрольний зразок з відомою концентрацією HBsAg - 1 фл., 1,3 мл.
- кон'югат № 1 (біотильовані поліклональні антитіла до HBsAg), готовий для використання - 1 фл., 13 мл;
- кон'югат № 2, (стрептавидин, кон'югований з пероксидазою хрому), готовий для використання - 1 фл., 13 мл;
- розчин для попереднього розведення сироваток (РПРС) - 1 фл., 12 мл;
- розчин для розведення сироваток (РРС) - 1 фл., 12 мл;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з Твін (ФСБ-Т × 25) - 1 фл., 28 мл;
- субстратної буферний розчин (СБР) - 1 фл., 13 мл;
- тетраметилбензидин, концентрат (ТМБ) - 1 фл., 1,0 мл;
- стоп-реагент - 1 фл., 12 мл;
- планшет для попереднього розведення зразків - 2 шт.;
- плівка для заклеювання планшета - 3 шт.;
- пластикова ванночка для реагентів - 3 шт.;
- наконечники для піпетки - 24 шт.;
- трафарет для побудови калібрувального графіка - 1 шт.;
- інструкція по застосуванню - 1 шт.

2.3. Аналітичні та діагностичні характеристики

Чутливість: мінімальна концентрація HBsAg, обумовлена за стандартом WHO International Standard Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code 00/588, - 0,05 МО / мл.

Відтворюваність. Коефіцієнт варіації за результатами визначення вмісту HBsAg в одному і тому ж зразку не перевищує 8%.

Діапазон калібрувальних зразків: 0-10 МО / мл.

Аналітичний діапазон вимірювань: 0,05-100 000 МО / мл.

3. 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.

4. ОБЛАДНАННЯ І МАТЕРІАЛИ

Фотометр вертикального сканування, Фотометр вертикального сканування Фотометр вертикального сканування Фотометр вертикального сканування Фотометр вертикального сканування шейкер – інкубатор, шошер, 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. ДОСЛІДЖУВАНІ ЗРАЗКИ

Для проведення одного аналізу потрібно 115 мкл сироватки (плазми) крові людини.

Вимоги до зразків

Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізованих, каламутну сироватку крові.

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 12 міс. Слід уникати багаторазового заморожування / відтавання, так як це може призвести до отримання неправильних результатів. Після розморожування зразки слід ретельно перемішати.

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. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

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.

При дробовому використанні набору після відбору частини вмісту флакони відразу щільно закрити кришками, помістити в холодильник і зберігати при 2-8 ° С протягом усього терміну придатності набору.

Калібрувальні та контрольні зразки, кон'югат № 1, кон'югат № 2 та стоп-реагент готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

6.1. Підготовка планшета

Розкрити пакет вище замку і встановити на рамку необхідне для проведення аналізу кількість стрипів. Що залишилися 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 усього терміну придатності набору.

6.2. Приготування розчину для промивання

Промивний розчин приготувати розведенням вихідного концентрату ФСБ-Т в 25 разів. Для цього в відповідності з числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) внести в мірний циліндр необхідну кількість концентрату ФСБ-Т і довести до відповідного об'єму дистильованою водою.

При випадінні 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.

6.3. Підготовка кон'югату № 1

У відповідності з числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість кон'югату № 1.

Залишки кон'югату № 1 з флакона або ванночки утилізувати (не зливати у флакон з вихідним кон'югатів № 1).

6.4. Підготовка кон'югату № 2

У відповідності з числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) відібрати в чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту необхідну кількість кон'югату № 2.

Залишки кон'югату № 2 з флакона або ванночки утилізувати (не зливати у флакон з вихідним кон'югатів № 2).

6.5. Приготування робочого розчину тетраметилбензидина

У відповідності з числом використовуваних стрипів (див. таблицю витрати компонентів) в окремий чистий флакон або в пластикову ванночку для реагенту внести необхідну кількість СБР, додати відповідну кількість концентрату ТМБ, ретельно перемішати.

Увага! Рекомендується виділити наконечники для піпеток, які використовувати тільки для роботи з тетраметилбензидином. Посуд і наконечники для піпетки, що контактують з розчином ТМБ, можна відмивати із застосуванням синтетичних миючих засобів, оскільки навіть їх сліди ведуть до неконтрольованого окислення ТМБ в ході реакції. Після роботи посуд і наконечники сполоснути водою, промити 70% етиловим спиртом і ретельно відмити дистильованою водою.

Допустимо голубе забарвлення робочого розчину ТМБ, яке не впливає на результати аналізу.

Зберігання: не більше 6 годин при 18-25 ° С в темряві.

Увага! При приготуванні розчину слід використовувати концентрат ТМБ, що входить в комплектацію даної серії набору.

6.6. Підготовка досліджуваних зразків

Увага! Зразки перед дослідженням ретельно перемішати.

При відборі проб занурювати наконечник в розчин не більше ніж на 2-3 мм.

Перед дозуванням змочувати наконечник дозується розчином 3-5 разів.

Кожен з досліджуваних зразків аналізується без розведення (цілісний), у розведенні 1/100 і 1/10 000.

Для розведення одного зразка знадобиться чотири лунки допоміжного планшета, наприклад, А-1, В-1, С-1, D-1.

В лунки А-1, С-1 допоміжного планшета внести по 135 мкл РПР, в лунки В-1, D-1-по 135 мкл РРС.

Розведення 1/100. У лунку А-1 внести 15 мкл цільного досліджуваного зразка. Поміняти наконечник, розчин в лунці

ретельно перемішати. Фіолетовий колір розчину має змінитися на синій. Потім з лунки А-1 відібрати 15 мкл розчину, перенести в лунку В-1. Поміняти наконечник, розчин в лунці ретельно перемішати. У лунці В-1 отримано розведення досліджуваного зразка 1/100.

Розведення 1/10 000. З лунки В-1 відібрати 15 мкл розчину, перенести в лунку С-1. Поміняти наконечник, розчин в лунці ретельно перемішати. Потім з лунки С-1 відібрати 15 мкл розчину, перенести в лунку D-1. Поміняти наконечник, розчин в лунці ретельно перемішати. У лунці D-1 отримано розведення досліджуваного зразка 1/10 000.

Аналогічно підготувати до аналізу всі досліджувані зразки. Зберігання: до 3 годин при 18-25 ° С.

7. ПРОВЕДЕННЯ ІФА

7.1. Внесення зразків

В лунки планшета з іммобілізованими антитілами до HBsAg, починаючи з верхніх лунок перших двох стрипів, внести по 100 мкл калібрувальних зразків 0; 0,05; 2; 5; 10 МО / мл і 100 мкл контрольного зразка.

В інші лунки внести по 100 мкл цільних досліджуваних зразків і в розведенні 1/100 і 1/10 000 (перенести з відповідних лунок допоміжного планшета, п. 6.6.). Таким чином, для аналізу одного зразка буде потрібно три лунки планшета.

7.2. Інкубація

Планшет заклеїти плівкою і інкубувати протягом 30 хв на шейкері при температурі 37 ° С з інтенсивністю перемішування 700 об / хв.

7.3. Промивка

По закінченні інкубації зняти липку плівку і помістити її в посудину з дезинфікуючим розчином. За допомогою промивального пристрою промити лунки планшета 5 разів розчином для промивання (п. 6.2.), Чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипу. У кожен лунку вносити не менш 400 мкл рідини в процесі кожного циклу промивки. Час між заповненням і спороженням лунок має бути не менше 30 сек.

Необхідно домагатися повного спороження лунок після кожного їхнього заповнення.

7.4. Внесення кон'югату № 1

В лунки планшета внести по 100 мкл кон'югату № 1.

Для внесення кон'югату № 1 використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

7.5. Інкубація

Планшет заклеїти плівкою і інкубувати протягом 30 хв на шейкері при температурі 37 ° С з інтенсивністю перемішування 700 об / хв.

По закінченні інкубації кон'югат № 1 з лунок не видаляти і лунки не промивати!

7.6. Внесення кон'югату № 2

В лунки планшета внести по 100 мкл кон'югату № 2.

Для внесення кон'югату № 2 використовувати пластикову ванночку і одноразові наконечники, що входять до складу набору.

7.7. Інкубація

Планшет заклеїти плівкою і інкубувати протягом 30 хв на шейкері при температурі 37 ° С з інтенсивністю перемішування 700 об / хв.

7.8. Промивка

По закінченні інкубації промити планшет 5 разів як описано вище (п. 7.3.).

7.9. Внесення робочого розчину тетраметілбензідіна

Внести до всіх лунок по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна (п. 6.5.).

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

7.10. Інкубація

Планшет витримати в захищеному від світла місці протягом 30 хв при температурі 18-25 ° С.

7.11. Внесення стоп-реагенту

Внести до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.

7.12. Проведення вимірювань

Виміряти оптичну щільність за допомогою спектрофотометра у двохвильовому режимі: основний фільтр - 405 нм, референс-фільтр - в діапазоні 620-655 нм. Допускається вимір тільки з фільтром 405 нм.

Важливо: час між зупинкою реакції і вимірюванням оптичної щільності не повинно перевищувати 5 хв.

8. УМОВИ ПРАВИЛЬНОСТІ РОБОТИ НАБОРУ

Результати аналізу досліджуваних зразків враховувати, якщо будуть виконані наступні умови:

- $OG0 \leq 0,1$ о.е.,
- $OG10 \geq 1,5$ о.е.,

де $OG0$, $OG10$ - значення оптичної щільності в лунках з калібрувальними зразками 0; 10 МО / мл відповідно.

- Значення концентрації HBsAg у контрольному зразку, обчислене за результатами ІФА, знаходиться в межах, вказаних на

етикетці флакона.

9. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

Результат аналізу вважати негативним, якщо $ОГ_{обр} < ОГ_{0,05}$, де $ОГ_{обр}$ - значення оптичної щільності в лунці з досліджуваним зразком, $ОГ_{0,05}$ - значення оптичної щільності в лунці з калібрувальним зразком 0,05 МО / мл. Такі зразки кількісному аналізу не підлягають.

Визначення концентрації HBsAg

Побудувати в лінійних координатах калібрувальний графік залежності оптичної щільності (вісь ординат) від концентрації HBsAg (вісь абсцис) у каліброваних зразках. Для цього на прикладеному трафареті для побудови графіка проти концентрації кожного калібрувального зразка відкласти відповідне їй значення оптичної щільності. Послідовно з'єднати отримані точки відрізками прямих ліній.

Визначити зміст HBsAg в аналізованому зразку по каліброване графіком. Для цього на осі ординат відзначити значення ОГ аналізованого зразка. Провести пряму лінію, паралельно осі абсцис, до перетину з калібрувальним графіком. Від точки перетину опустити перпендикуляр на вісь абсцис. За отриманою точці перетину визначити значення концентрації HBsAg в зразку.

Для визначення концентрації HBsAg в аналізованих зразках використовувати значення оптичної щільності в лунці з найбільшим розведенням зразка, що задовольняє умові: $ОГ_{0,05} \leq ОГ_{обр} \leq ОП10$.

Отримане значення концентрації помножити на фактор розведення. Якщо значення ОГ аналізованого зразка в розведенні 1/10 000 перевищує ОГ калібрувального зразка 10 МО / мл, слід повторити аналіз зразка в розведенні 1/1 000 000 (алгоритм розведення див. п. 6.6.).

При використанні для розрахунків концентрації комп'ютерного або вбудованого в спектрофотометр програмного забезпечення в налаштуваннях вибрати метод, відповідний кусочно-лінійної апроксимації.

10. ДІАГНОСТИЧНА ЗНАЧИМІСТЬ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Кількісна оцінка HBsAg в сироватці крові дозволяє диференціювати форми хронічної HBV-інфекції, визначити показання до противірусної терапії, є інструментом для вибору тактики лікування хронічного гепатиту В та прогнозування його ефективності, зокрема, при використанні пегільованих інтерферонів альфа.

При динамічному спостереженні пацієнта для отримання результатів, які адекватно відображають зміну HBsAg 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

КОРОТКА СХЕМА ІФА

Внести:	по 100 мкл калібрувальних зразків, контрольного зразку, досліджуваних зразків (цільних, 1/100, 1/10 000)
Інкубувати:	30 хв, 37 С, 700 об/хв
Промити:	промиваючим розчином, 400 мкл., 5 разів
Внести:	по 100 мкл кон'югату №1
Інкубувати:	30 хв, 37 С, 700 об/хв
	По закінченню інкубації кон'югат №1 з лунок не видаляти та лунки не промивати!
Внести:	по 100 мкл кон'югату №1
Інкубувати:	30 хв, 37 С, 700 об/хв
Промити:	промиваючим розчином, 400 мкл., 5 разів
Внести:	по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензедіну
Інкубувати:	30 хв при температурі 18-25 С у темному місці
Внести:	по 100 мкл стоп-реагенту
Виміряти:	ОГ при 405 нм / 620-655 нм