

«___» _____ 2012 р

ІНСТРУКЦІЯ

з використання набору реагентів

«НВ-АГ/АТ-БЕСТ»

Імуноферментна тест-система для одночасного виявлення НВsAg та сумарних антитіл до НВcoreAg

Призначення

Імуноферментна тест-система “**НВ-АГ/АТ-БЕСТ**” призначена для одночасного виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (НВsAg) та сумарних антитіл до НВcoreAg у сироватці чи плазмі крові людини методом імуноферментного. Набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, включаючи контрольні зразки. Чутливість до НВsAg - 0,05 нг./мл. Специфічність до анти- НВcoreAg - 100 % .

1. Склад набору (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з іммобілізованими моноклональними антитілами до НВs-антигену та рекомбінантний НВcoreAg;
 - концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) - 25-ти кратний концентрат фосфатно-сольового буферу з твіном (безбарвна прозора рідина), - 1 фл.;
 - позитивний контроль К+АТ - сироватка, що містить антитіла до НВcoreAg (рідина синього кольору) - 1 фл.;
 - позитивний контроль К+АГ - розчин, що містить рекомбінантний НВs-антиген (рідина червоного кольору), - 1 фл.;
 - негативний контроль К- - сироватка інактивована (рідина жовтого кольору), - 1 фл.;
 - кон'югат №1 (К1) - моноклональні антитіла до НВs-антигену з біотином (безбарвна рідина), - 1 фл.;
 - розчин для розведення кон'югату №1 РРК1 - (рідина синього кольору), - 1 фл.;
 - кон'югат №2 (К2) – стрептавидин, кон'югований з пероксидазою хрому (безбарвна рідина), - 1 фл.;
 - розчин для розведення кон'югату №2 РРК2 - (рідина помаранчево-червоного кольору), - 1 фл.;
 - кон'югат №3 (К3) - рекомбінантний НВcoreAg, кон'югований з пероксидазою хрому (рідина зеленого кольору), - 1 фл.;
 - субстратно буферний розчин СБР – (безбарвно рідина), - 1 фл.;
 - хромоген - розчин ТМБ (прозора рідина), - 1 фл.;
 - стоп-реагент - (прозора безбарвна рідина), - 1 фл.;
- Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

2. 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.

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. Спосіб застосування

4.1. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові, що досліджуються, можна зберігати за температури від 2 °С до 8 °С не більше 3 діб після забору. Зберігання зразків більш тривалий період допускається за температури від мінус 20 °С до мінус 70 °С. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують за кімнатної температури протягом 30 хвилин

4.2. Підготовка реагентів

Перед використанням всі реагенти набору витримують за кімнатної температури від 17 °С до 27 °С протягом 30 хвилин і ретельно перемішують.

4.2.1. Підготовка планшету-імуносорбенту

Планшет-імуносорбент витримайте 30 хвилин за кімнатної температури. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість стрипів, а решту відразу ж ретельно упакуйте та зберігайте за температури від 2 °С до 8 °С. Зберігання запакованого планшету забезпечує його стабільність протягом 1-го місяця.

4.2.2. Приготування робочого розчину ФСБ-Т (для промивання планшетів)

Робочий розчин ФСБ-Т готується за 15 хвилин до проведення аналізу. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину ФСБ-Т прогрійте флакон за температури 37 °С протягом 15-20 хвилин до повного розчинення солей.

Вміст одного флакону ФСБ-Т (x25) розвести у 25 разів водою очищеною та ретельно перемішати. У разі використання для проведення аналізу одного або кількох стрипів планшету відібрати необхідну кількість розчину ФСБ-Т (x25) та води очищеної згідно таблиці 1.

Таблиця 1

Об'єм, мл.	Кількість стрипів, шт.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ФСБ-Т (x25)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Вода очищена	до 50	до 100	до 150	до 200	до 250	до 300	до 350	до 400	до 450	до 500	до 550	до 600
РРК1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
кон'югат №1(К1)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
РРК2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
кон'югат №2 (К2)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
кон'югат №3 (К3)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
СБР	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
ТМБ	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30	0,33	0,40

Зберігання: ФСБ-Т (x25) зберігається на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.3. Підготовка контрольних зразків

Контрольні зразки К- та К+ готові до використання.

Зберігання: К- та К+ зберігаються у закритому флаконі за температури від 2 °С до 8 °С на протязі терміну придатності набору.

4.2.4. Підготовка РРК1, РРК2 та СБР

РРК1, РРК2 та СБР готові до використання. Перед використанням вміст флаконів ретельно перемішати.

Зберігання: розчини **РРК1, РРК2 та СБР** зберігаються на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.5. Підготовка робочого розчину кон'югату № 1 (для процедури 1 і 3)

Робочий розчин (К1) готується безпосередньо перед використанням. Із флакону (К1) відібрати вказаний на етикетці флакону об'єм та перенести його до флакону з **РРК1**. У разі використання для проведення аналізу одного або кількох стрипів планшету відібрати необхідну кількість (К1) та **РРК1** згідно таблиці 1. Розчини ретельно перемішати без утворення піни.

Зберігання: розчин (К1) зберігається не більше ніж 5 хвилин за температури від 17 °С до 27 °С, залишок (К1) зберігають на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.6. Підготовка робочого розчину кон'югату № 2 (для процедури 1)

Робочий розчин (К2) готується безпосередньо перед використанням. Із флакону (К2) відібрати вказаний на етикетці флакону об'єм та перенести його до флакону з **РРК2**. У разі використання для проведення аналізу одного або кількох стрипів планшету відібрати необхідну кількість (К2) та **РРК2** згідно таблиці 1. Розчини ретельно перемішати без утворення піни.

Зберігання: розчин (К2) зберігається не більше ніж 5 хвилин за температури від 17 °С до 27 °С, залишок (К2) зберігають на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.7. Підготовка робочого розчину кон'югату № 2 (для процедури 1)

Робочий розчин (К3) готується безпосередньо перед використанням. Із флакону (К3) відібрати вказаний на етикетці флакону об'єм та перенести його до флакону з **РРК2**. У разі використання для проведення аналізу одного або кількох стрипів планшету відібрати необхідну кількість (К3) та **РРК2** згідно таблиці 1. Розчини ретельно перемішати без утворення піни.

Зберігання: розчин (К3) зберігається не більше ніж 5 хвилин за температури від 17 °С до 27 °С, залишок (К3) зберігають на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.8. Підготовка робочого розчину суміші кон'югатів № 2 і № 3 (для процедури 3)

Робочий розчин суміші кон'югатів (К2) і (К3) готується безпосередньо перед використанням. Із флакону (К2) відібрати вказаний на етикетці флакону об'єм та перенести його до флакону з **РРК2**. Розчини ретельно перемішати без утворення піни. Із флакону (К3) відібрати вказаний на етикетці флакону об'єм та перенести його до отриманого розчину кон'югату № 2. У разі використання для проведення аналізу одного або кількох стрипів планшету відібрати необхідну кількість (К2), (К3) та **РРК2** згідно таблиці 1. Розчини ретельно перемішати без утворення піни.

Зберігання: розчин суміші (К2) і (К3) зберігається не більше ніж 5 хвилин за температури від 17 °С до 27 °С, залишок (К3) зберігають на протязі терміну придатності набору за температури від 2 °С до 8 °С у щільно закритому флаконі.

4.2.9. Підготовка робочого розчину ТМБ

Робочий розчин готується безпосередньо перед використанням в захищеному від світла місці. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину ТМБ прогрійте флакон за 37 °С протягом 3-5 хвилин до повного розчинення ТМБ. При використанні для проведення аналізу одного або декількох стрипів планшету у чистий флакон відібрати необхідну кількість ТМБ та СБР згідно таблиці 1. Розчин ретельно перемішати без утворення піни.

4.2.10. Підготовка стоп-реагенту

Стоп-реагент готовий до використання.

Зберігання: не обмежено.

5. Процедура аналізу

5.1. Перед початком роботи відокремте необхідну кількість стрипів та закріпіть їх на рамці. Решту стрипів відразу ж ретельно запакуйте у пакет з вологопоглиначем.

5.2. Заповнити бланк внесення проб.

5.3. Виявлення HBsAg (процедура 1)

5.3.1. Внести в лунки стрипів контрольні та досліджувані зразки в наступному порядку:

в лунки А1, В1 — по 100 мкл. К+АГ, в лунки С1, D1 — по 100 мкл. К-, в решту лунок — по 100 мкл. досліджуваних сироваток. До всіх лунок внести по 50 мкл. робочого розчину (К1) (приготування п. 4.2.5).

5.3.2. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 40 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.3.3. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів розчином для промивання з використанням автоматичного промивача або 8-канального дозатору наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менше ніж на 380 мкл. розчином ФСБ-Т 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 6 разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрквалному паперу.

5.3.4. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину (К2) (приготування п. 4.2.6.).

5.3.5. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.3.6. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів згідно п. 5.3.3.

5.3.7. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину ТМБ (приготування п. 4.2.9.).

5.3.8. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин в захищеному від світла місці за температури 37 °С.

5.3.9. Зупинити реакцію внесенням в кожну лунку планшета по 50 мкл. стоп-реагенту.

5.3.10. Виміряти величину оптичної густини (ОГ) розчинів в лунках планшета на спектрофотометрі у двохвольовому режимі при довжині хвилі 450/620 нм. або в однохвольовому режимі при 450 нм. (нульовий рівень ("бланк") встановити по повітрю). Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

5.4. Виявлення сумарних антитіл до HBscoreAg (процедура 2)

5.4.1. Внести в лунку стрипів контрольні та досліджувані зразки в наступному порядку:

в лунки А1, В1 — по 100 мкл. К+АТ, в лунки С1, D1 — по 100 мкл. К-, в решту лунок — по 100 мкл. досліджуваних сироваток. До всіх лунок внести по 50 мкл. робочого розчину **РРК1** (приготування п. 4.2.4.).

5.4.2. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 40 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.4.3. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів розчином для промивання з використанням автоматичного промивача або 8-канального дозатору наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менше ніж на 380 мкл. розчином ФСБ-Т 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 6 разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрквалному паперу.

5.4.4. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину (К3) (приготування п. 4.2.7.).

5.4.5. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.4.6. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів згідно п. 5.4.3.

5.4.7. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину ТМБ (приготування п. 4.2.9.).

5.4.8. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин в захищеному від світла місці за температури 37 °С.

5.4.9. Зупинити реакцію внесенням в кожну лунку планшета по 50 мкл. стоп-реагенту.

5.4.10. Виміряти величину оптичної густини (ОГ) розчинів в лунках планшета на спектрофотометрі у двохвольовому режимі при довжині хвилі 450/620 нм. або в однохвольовому режимі при 450 нм. (нульовий рівень ("бланк") встановити по повітрю). Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

5.5. Одночасне виявлення HBsAg та сумарних антитіл до HBscoreAg (процедура 3)

5.5.1. Внести в лунку стрипів контрольні та досліджувані зразки в наступному порядку:

в лунки А1, В1 — по 100 мкл. К+АТ, в лунки С1, D1 — по 100 мкл. К+АТ, в лунки Е1, F1 — по 100 мкл. К- в решту лунок — по 100 мкл. досліджуваних сироваток.

5.5.2. Внести в кожну лунку планшета по 50 мкл. розчину К-1 (приготування п. 4.2.5.).

5.5.3. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 40 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.5.4. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів розчином для промивання з використанням автоматичного промивача або 8-канального дозатору наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менше ніж на 380 мкл. розчином ФСБ-Т 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 6 разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрквалному паперу.

5.5.5. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину (К2) і (К3) (приготування п. 4.2.8.).

5.5.6. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин за температури 42 °С на шейкері при швидкості обертання платформи від 700 до 800 об./хв.

5.5.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити 5 разів згідно п. 5.5.3.

5.5.8. Внести в кожну лунку планшета по 100 мкл. робочого розчину ТМБ (приготування п. 4.2.6.).

5.5.9. Планшет заклеїти клейкою плівкою та інкубувати протягом 20 хвилин в захищеному від світла місці за температури 37 °С.

5.5.10. Зупинити реакцію внесенням в кожну лунку планшета по 50 мкл. стоп-реагенту.

5.5.11. Виміряти величину оптичної густини (ОГ) розчинів в лунках планшета на спектрофотометрі у двохвольовому режимі при довжині хвилі 450/620 нм. або в однохвольовому режимі при 450 нм. (нульовий рівень ("бланк") встановити по повітрю). Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

6. Облік результатів та їх інтерпретація

6.1. Облік результатів та їх інтерпретація для виявлення HBsAg (процедура 1).

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- середнє значення ОГ в лунках з К- (ОГК-сер.) не перевищує значення 0,20;
 - кожне окреме значення ОГК- не повинно відхилитися від ОГК-сер. Більш ніж на 20 %;
 - середнє значення ОГ в лунках з К+АГ (ОГК+сер.) повинно бути більше 1,0;
- Рівень критичного значення (Cut off) розрахувати за формулою (1):

$$\text{ОГ}_{\text{крит.}} = \text{ОГ-сер.} + 0,10 \quad (1)$$

де ОГК-сер. - середнє значення ОГ К- по двом лункам.

Для кожного досліджуваного зразка можна розрахувати індекс позитивності (ІП) за формулою (2):

$$\text{ІП} = \frac{\text{ОГ}_{\text{зразка}}}{\text{ОГ}_{\text{крит.}}} \quad (2)$$

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище або дорівнює 1,0** вважати **позитивним (ІП ≥ 1,0)**.

Зразки із значенням ІП **нижче 1,0** вважати **негативним (ІП < 1,0)**.

6.2. Облік результатів та їх інтерпретація для виявлення сумарних антитіл до HBcoreAg (процедура 2)

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- значення ОГ К+АТ більше ОГкрит;
- середнє значення ОГ в лунках з К- (ОГК-сер.) не перевищує значення 0,2.

Рівень критичного значення (Cut off) розрахувати за формулою (3):

$$\text{ОГ}_{\text{крит.}} = \text{ОГ-сер.} + 0,20 \quad (3)$$

де ОГК-сер. - середнє значення ОГ К- по двом лункам.

Для кожного досліджуваного зразка можна розрахувати індекс позитивності (ІП) за формулою (2).

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище або дорівнює 1,0** вважати **позитивним (ІП ≥ 1,0)**.

Зразки із значенням ІП **нижче 1,0** вважати **негативним (ІП < 1,0)**.

6.3. Облік результатів та їх інтерпретація для одночасного виявлення HBsAg та сумарних антитіл до HBcoreAg (процедура 2)

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- середнє значення ОГ в лунках з К- (ОГК-сер.) не перевищує значення 0,20;
- кожне окреме значення ОГК- не повинно відхилитися від ОГК-сер. Більш ніж на 20%;
- середнє значення ОГ в лунках з К+АГ (ОГК+АГсер.) повинно бути більше 1,0;
- середнє значення ОГ в лунках з К+АТ (ОГК+АТсер.) повинно бути більше ОГкрит.;

Рівень критичного значення (Cut off) розрахувати за формулою (4):

$$\text{ОГ}_{\text{крит.}} = \text{ОГК-сер.} + 0,10 \quad (4)$$

де ОГК-сер. - середнє значення ОГ К- по двом лункам.

Для кожного досліджуваного зразка можна розрахувати індекс позитивності (ІП) за формулою (2).

Досліджувані зразки із значенням ІП **вище або дорівнює 1,0** вважати **позитивним (ІП ≥ 1,0)**.

Зразки із значенням ІП **нижче 1,0** вважати **негативним (ІП < 1,0)**.

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.