

### **ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ**

#### **Набір реагентів для імуноферментного виявлення HBs-антигену вірусу гепатиту В HBsAg-ультра-БЕСТ**

##### **1. ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір реагентів «HBsAg-ультра-БЕСТ» призначений для виявлення HBs-антигену різних субтипів і форм (у тому числі мутантів) методом імуноферментного аналізу (ІФА) в зразках сироватки (плазми) крові людини і може бути використаний для обстеження донорів крові, органів, тканин людини і диференціальної діагностики вірусних гепатитів.

Чутливість - 0,01 МЕ/мл. Специфічність – 100%.

Один набір розрахований на проведення: (комплект 1) - 96 аналізів, (комплект 2) - 192 аналізи, (комплект 3) – 480 аналізів включаючи контролю. Всі набори стрипової комплектації.

Набір адаптований для постановки ІФА на аналітичних аналізаторах відкритого типу («TECAN SUNRISE», виробник «TECAN», «PR-2100», виробник «BIO-RAD», «MULTISCAN», виробник «Labsystems»,).

##### **2. СКЛАД НАБОРУ** (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет з імобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg, – 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (K+), – 1 фл.;
- слабопозитивний контрольний зразок, інактивований (K+слаб.; концентрація HBsAg (0,05±0,02) МЕ/МЛ), – 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (K-), – 1 фл.;
- кон'югат №1, концентрат (біотинильовані поліклональні антитіла до HBsAg) – 1 фл.;
- кон'югат №2, концентрат (стрептавидин, кон'югований з пероксидазою хрому) – 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату № 1 (РПК №1) – 2 фл. по 7,0 мл;
- розчин для розведення кон'югату № 2 (РПК №2) – 1 фл.;
- субстратний буферний розчин (СБР) – 1 фл.;
- тетраметілбензідін, концентрат (ТМБ) – 1 фл.;
- стоп-реагент – 1 фл.;

Набір може додатково комплектуватися ванночками для реактивів, наконечниками для піпеток, плівкою для заклеювання планшетів.

##### **3. ЗАПОБІЖНІ ЗАСОБИ**

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. УСТАТКУВАННЯ 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.

##### **5. АНАЛІЗОВАНІ ЗРАЗКИ**

**5.1.** Для проведення аналізу не слід використовувати гемолізовану, каламутну сироватку крові.

**5.2.** Зразки сироватки (плазми) крові можна зберігати при температурі від 2 до 8°C не більше 5 діб за умови відсутності мікробної контамінації або при температурі мінус 20°C (і нижче) не більше 3 міс. Слід уникати багатократного заморожування / відтавання, оскільки це може привести до здобуття неправильних результатів. Після розморожування зразки слід ретельно перемішати.

**5.3.** Зразки сироваток крові, що містять осад, необхідно очистити центрифугуванням при 5000–10000 об/хв протягом 5 хв при температурі від 18 до 25°C.

## 6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ ДЛЯ АНАЛІЗУ (розрахунок на один планшет)

6.1. Перед роботою витягнути набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі компоненти при температурі 18–25°C протягом 60 хв.

### 6.2. ПІДГОТОВКА ПЛАНШЕТА

Безпосередньо перед використанням цефленовий пакет з планшетом розкрити з боку застібки, відступивши приблизно 1 см, і витягнути планшет.

### 6.3. ПРИГОТУВАННЯ ПРОМИВАЮЧОГО РОЗЧИНУ

Промивальний розчин приготувати розведенням вихідного концентрату фосфатно-сольового буферного розчину з твіном в 25 разів.

При випаданні осаду солей в концентраті необхідно прогріти його при температурі 30–40°C до повного розчинення осаду.

### 6.4. ПІДГОТОВКА КОНТРОЛЬНИХ ЗРАЗКІВ

Контрольні зразки готові до використання і не вимагають додаткового розведення.

Після відбору частини вмісту контрольні зразки можна зберігати при температурі 2–8°C протягом всього терміну придатності.

### 6.5. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧОГО РОЗЧИНУ КОН'ЮГАТУ № 1

У відповідності з кількістю стрипів для використання (див. таб. витрат компонентів), в пластикову ванночку внести необхідну кількість РРК №1 та додати відповідну кількість кон'югату №1, ретельно перемішати.

Зберігання: до 6 годин при 18–25°C.

### 6.6. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧОГО РОЗЧИНУ КОН'ЮГАТУ № 2

У відповідності з кількістю використовуваних стрипів (див. таблицю витрат компонентів) у пластикову ванночку для реагентів, що входить у склад набору, внести необхідну кількість РРК № 2 та додати відповідну кількість концентрату кон'югату № 2, ретельно перемішати.

Зберігання: до 6 годин при 18-25 С.

### Таблиця витрат компонентів набору реагентів

Кількість використуваних стрипів	Робочий розчин кон'югату № 1		Робочий розчин кон'югату № 2		Робочий розчин тетраметілбензедину		Промиваючий розчин	
	Кон'югат № 1, концентрат, мкл	РРК № 1, мкл	Кон'югат № 2, концентрат, мкл	РРК № 2, мкл	ТМБ, концентрат, мкл	СБР, мл	ФСБх25, концентрат, мкл	Дистилювана вода, мл
1	50	0,5	100	1,0	0,05	1,0	3,0	до 75
2	100	1,0	200	2,0	0,10	2,0	6,0	до 150
3	150	1,5	300	3,0	0,15	3,0	9,0	до 225
4	200	2,0	400	4,0	0,20	4,0	12,0	до 300
5	250	2,5	500	5,0	0,25	5,0	15,0	до 375
6	300	3,0	600	6,0	0,30	6,0	18,0	до 450
7	350	3,5	700	7,0	0,35	7,0	21,0	до 525
8	400	4,0	800	8,0	0,40	8,0	24,0	до 600
9	450	4,5	900	9,0	0,45	9,0	27,0	до 675
10	500	5,0	1000	10,0	0,50	10,0	30,0	до 750
11	550	5,5	1100	11,0	0,55	11,0	33,0	до 825
12	600	6,0	1200	12,0	0,60	12,0	36,0	до 900

### 6.7. ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧОГО РОЗЧИНУ ТМБ

У відповідності з кількістю стрипів для використання (див. таб. витрат компонентів) в окремий чистий флакон або пластикову ванночку внести необхідну кількість СБР, додати відповідну кількість концентрату ТМБ, ретельно перемішати.

*Допустиме блакитне забарвлення робочого розчину ТМБ, яке не впливає на результати аналізу.*

Зберігання: не більше 3 годин при 18–25°C в темному місці.

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

6.8. Стоп-реагент готовий до використання.

## 7. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

**7.1.** Внесення контрольних і досліджуваних зразків.

До лунок планшета, наприклад, А-1, В-1, С-1 внести по 100 мкл К<sup>-</sup>; у лунки D-1 і Е-1 – по 100 мкл К<sup>+</sup>; у лунки F-1 і G-1 – по 100 мкл К<sup>+</sup>слаб.; у останніх – по 100 мкл досліджуваних зразків.

**7.2.** Внести до всіх лунок по 50 мкл робочого розчину кон'югату № 1 (п. 8.5.), *не торкаючись наконечниками стінок лунок! Спостерігається кольорова індикація.*

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

**7.3.** Інкубувати у термостатуємому шейкері з інтенсивністю перемішування 700 об/мін: 40 хв. при 42°C або 60 хв. при 37°C.

**7.4.** Після закінчення інкубації зняти липку плівку і помістити її в судину з дезінфікуючим розчином. За допомогою промивального пристрою\* промити лунки планшета 5 разів промивальним розчином (п. 8.3.), чергуючи аспірацію і негайне заповнення лунок кожного стрипу. У кожен лунку вносити не менше 400 мкл рідини в процесі кожного циклу промивання. Час між заповненням і спорожненням лунок має бути не менше 30 сек. Необхідно добиватися повного спорожнення лунок після кожного їх заповнення. По закінченні промивання залишки вологи з лунок ретельно видалити, постукуючи перевернутим планшетом по фільтрувальному паперу.

Примітка: Промивання за допомогою автоматичного промивача рекомендується проводити в режимі з переповнюванням («Overflow») з 5-у циклами промивання і внесенням до лунок по 600–700 мкл робочого промивального розчину. При цьому слід використовувати поперечну аспірацію розчину з лунок (режим «Crosswise»).

**7.5.** Внести до всіх лунок по 100 мкл робочого розчину кон'югату № 2 (п. 8.6.).

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

**7.6.** Інкубувати в термошейкері з інтенсивністю перемішування 700 об/хв.: 30 хв при 42°C або 30 хв. при 37°C.

**7.7.** Після закінчення другої інкубації вміст лунок видалити в судину з дезінфікуючим розчином і промити планшет 5 разів як описано в п. 7.4.

**7.8.** Внести до всіх лунок по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна (п. 8.7.) і інкубувати в темному місці протягом 30 хв. при температурі 18–25°C.

**7.9.** Внести до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.

## 8. РЕЄСТРАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Виміряти величину оптичної щільності розчинів в лунках на спектрофотометрі вертикального сканування в двохвольовому режимі: при основній довжині хвилі 450 нм і довжині хвилі порівняння в діапазоні 620–655 нм; допускається вимір на одній довжині хвилі – 450 нм.

Час між зупинкою реакції і виміром оптичної щільності не повинен перевищувати 5 хв.

## 9. КОРОТКА СХЕМА ІФА

*Використовувати лише після ретельного ознайомлення з інструкцією!*

### 9.1. ТЕРМОШЕЙКЕР, 42°C

**Внести:** по 100 мкл К<sup>+</sup>, К<sup>+</sup>слаб., К<sup>-</sup>, аналізованих зразків.

**Внести:** по 50 мкл робочого розчину кон'югата №1.

**Інкубувати:** 40 хв., 700 об/хв.

**Промити:** промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.

**Внести:** по 100 мкл робочого розчину кон'югата №2.

**Інкубувати:** 30 хв., 700 об/хв.

**Промити:** промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.

**Внести:** по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.

**Інкубувати:** 30 хв. при 18–25°C в темному місці.

**Внести:** по 100 мкл стоп-реагенту.

**Виміряти:** ОП при 450 нм / референсна довжина хвилі 620–655 нм.

### 9.2. ТЕРМОШЕЙКЕР, 37°C

**Внести:** по 100 мкл К<sup>+</sup>, К<sup>+</sup>слаб., К<sup>-</sup>, аналізованих зразків.

**Внести:** по 50 мкл робочого розчину кон'югата №1.

**Інкубувати:** 60 хв., 700 об/хв.  
**Промити:** промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.  
**Внести:** по 100 мкл робочого розчину кон'югата №2.  
**Інкубувати:** 30 хв., 700 об/хв.  
**Промити:** промивальним розчином, 400 мкл, 5 разів.  
**Внести:** по 100 мкл робочого розчину тетраметілбензідіна.  
**Інкубувати:** 30 хв. при 18–25°C в темноті.  
**Внести:** по 100 мкл стоп-реагенту.  
**Виміряти:** ОП при 450 нм / референсна довжина хвилі 620–655 нм.

## 10. РОЗРАХУНКИ І ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

### 10.1. РОЗРАХУНКИ

**10.1.1.** Розрахувати середнє арифметичне значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком – ОГ<sub>сер. К-</sub>.

**10.1.2.** На підставі отриманих даних обчислити критичне значення оптичної густини (ОГ<sub>крит.</sub>) за формулою:

$$\text{ОГ}_{\text{крит.}} = \text{ОГ}_{\text{сер. К-}} + 0,05$$

### 10.2. ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ

**10.2.1.** Середнє значення оптичної густини в лунках з негативним контрольним зразком не повинне перевищувати 0,15 од. опт. густини.

**10.2.2.** Значення ОГ К- в кожній лунці повинне знаходитися в межах від 0,6хОГ<sub>сер.К-</sub> до 1,4хОГ<sub>сер.К-</sub>. Значення ОГ К-, що виходить з цих меж, слід виключити, а ОГ<sub>сер.К-</sub> перерахувати.

**10.2.3.** Середнє значення оптичної щільності в лунках з позитивним контрольним зразком має бути не менше 1,0 од. опт. густини.

**10.2.4.** Середнє значення оптичної густини в лунках із слабопозитивним контрольним зразком повинно бути більше ОГ<sub>крит.</sub>.

**10.2.5.** Результат аналізу вважають **позитивним**, якщо ОГ<sub>зразка</sub> ≥ ОГ<sub>крит.</sub>

Результат аналізу вважають **негативним**, якщо ОГ<sub>зразка</sub> < ОГ<sub>крит.</sub>  
де ОПобр. – оптична щільність в лунці з аналізованим зразком сироватки (плазми) крові.

**10.2.6.** Позитивний результат, отриманий в постановці набору реагентів «HBsAg-ультра-БЕСТ», має бути підтверджений в реакції нейтралізації з використанням набору «HBsAg-ультра-БЕСТ-підтверджуючий».

При динамічному спостереженні пацієнта для здобуття результатів, адекватно тих, що відображають зміну концентрації HBsAg в крові, необхідно використовувати набори реагентів одного найменування (одного підприємства-виробника).

## 11. УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набори зберігати і транспортувати при (2-8)°С. Допускається транспортування при температурі до 25°C 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.