

ІНСТРУКЦІЯ  
з використання набору реагентів

**«HBsAg--БЕСТ»**

Тест-система імуноферментна для виявлення та підтвердження вмісту Hbs-антигену вірусу гепатиту В

**ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір реагентів «HBsAg-скрин-БЕСТ» призначений для виявлення HBs-антигену різних субтипів і форм 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.

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»).

**СКЛАД НАБОРУ** (з розрахунку на 1 планшет)

- планшет розбірний з імобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg - 1 шт.;
- позитивний контрольний зразок, інактивований (K+), рекомбінантний HBsAg в концентрації не менше 5,0 МО/мл., прозора або зі слабкою опалесценцією рідина з жовтим відтінком - 1 фл.;
- слабопозитивний контрольний зразок, інактивований (K+слаб); в концентрації 0,1 МО/мл; прозора або злегка опалесцююча рідина з жовтим відтінком різної інтенсивності або аморфна маса білого кольору з жовтим відтінком, після розчинення - опалесцююча рідина слабо - жовтого кольору - 1 фл.;
- негативний контрольний зразок, інактивований (K-), рідина з жовтим відтінком – 1 фл.;
- кон'югат, антитіла до HBsAg, мічені пероксидазою хрину; (рідина червоного кольору) – 1 фл.;
- концентрат фосфатно-сольового буферного розчину з твіном (ФСБ-Тх25) – 1 фл.;
- розчин для розведення кон'югату (РК) – 1 фл.;
- цитратний буферний розчин (ЦБР) – 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.

**АНАЛІТИЧНІ І ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Аналітична чутливість яка визначається за допомогою набору - 0,05 МО/мл.

Діагностична специфічність - 100%.

**ДОСЛІДЖУВАЛЬНІ ЗРАЗКИ**

Нативна сироватка (плазма) крові людини об'ємом не менше 100 мкл.

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.

**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.

**СПОСІБ ЗАСТОСУВАННЯ**

**"РУЧНА" ПОСТАНОВКА**

**Обладнання та 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.

### Приготування робочих розчинів реагентів для ІФА

Перед роботою витягти набір з холодильника, розкрити упаковку і витримати всі реагенти перед проведенням аналізу не менше 30 хв при температурі від 18 до 25 С.

### Приготування робочих розведень контрольних зразків

За 10 хв до проведення ІФА у флакон з ліофілізованим К+ слаб. додати 1,0 мл води очищеної і акуратно перемішати. Розведений К + слаб. зберігати не більше 7 діб при температурі від 2 до 8 С.

### Приготування робочого розчину для промивання (ФСБ-Т)

При випаданні осаду солей в ФСБ-Т (x25) прогріти його при температурі 37 С до повного розчинення осаду.

При використанні одного планшета 40 мл ФСБ-Т (x25) довести водою очищеною до 1 л.

При дробовій постановці використовувати співвідношення обсягів ФСБ-Т (x25) і води, зазначені в табл. 1 для різної кількості використовуваних стрипів.

Таблиця 1

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ФСБ-Т(x25), мл	3	7	10	13	17	20	23	27	30	33	37
Вода очищена, мл	до 75	до 175	до 250	до 325	до 425	до 500	до 575	до 675	до 750	до 825	до 925

Готовий робочий розчин для промивання зберігати при температурі від 2 до 8 °С не більше 14 діб.

### Приготування робочого розведення кон'югату

Готувати не менше ніж за 10 хв до використання.

Кон'югат розвести РРК у співвідношенні 1:1.

При одночасному використанні комплексу об'єднати вміст флаконів з кон'югатом та з РРК, ретельно перемішати.

При дробовій постановці використовувати співвідношення обсягів кон'югату та РРК, зазначені в табл. 2 для різної кількості числа використовуваних стрипів.

Таблиця 2

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Кон'югат, мл	0,25	0,45	0,65	0,85	1,05	1,25	1,45	1,65	1,85	2,05	2,25	2,6
РРК, мл	0,25	0,45	0,65	0,85	1,05	1,25	1,45	1,65	1,85	2,05	2,25	2,6

### Приготування субстратно-індикаторного розчину

Готувати перед використанням у місці, захищеному від дії прямого сонячного світла.

При використанні одного планшета 1,0 мл ТМБ внести у флакон з 20 мл ЦБР, ретельно перемішати

При дробовій постановці використовувати співвідношення обсягів ТМБ і ЦБР, зазначені в табл. 3 для різної кількості числа використовуваних стрипів.

Таблиця 3

Кількість стрипів	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ТМБ, мл	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6
ЦБР, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Субстратно-індикаторний розчин стабільний не менше 3 год. при температурі від 18 до 25 С в захищеному від світла місці.

### Приготування інших реагентів

Імуносорбент, К +, К -, рідкий К + слаб., стоп-реагент - готові до застосування ..

Після розкриття упаковок невикористані реагенти допускається зберігати в щільно закритих упаковках при температурі від 2 до 8 С до закінчення терміну придатності.

### Проведення ІФА

**Увага! Дотримання вказаних нижче температури і часу інкубації планшетів на кожній стадії постановки вкрай важливо для отримання достовірних результатів.**

1. Витягти з упаковки рамку планшета та необхідну кількість стрипів. Невикористані стрипи допускається зберігати в щільно закритому пакеті з вологопоглиначем при температурі від 2 до 8 С до закінчення терміну придатності.

2. В одну лунку (напр., А1) внести 100 мкл К +; в одну лунку (напр., В1) - 100 мкл К + сл; в три лунки (напр., С1, D1, E1) - по 100 мкл К- . В інші лунки планшета внести по 100 мкл досліджуваних зразків. В усі лунки внести по 50 мкл розчину кон'югату. Вміст лунок перемішати, акуратно постукуючи по краю планшета.

3. Планшет закрити кришкою або клейкою плівкою.

Інкубуйте

1 год 15 хв при 44 оС на шейкері (500 об / хв), або

2 год при 44 о С в термостаті, або

2 год. при 37 о С на шейкері (500 об / хв).

Допускається використовувати також такі режими інкубації:

1 год при 44 оС на шейкері (500 об / хв), або

1 год 30 хв при 37 оС на шейкері (500 об / хв), або

2 год при 37 оС в термостаті,

однак при трьох останніх режимах чутливість тест-системи знижується (показник аналітичної чутливості збільшується з 0,05 нг / мл до 0,1 нг / мл).

4. Після закінчення інкубації аспирувати вміст лунок і промити лунки планшета 5 разів розчином для промивання та 1 раз водою дистильованою в режимі «overflow» або 7 разів розчином для промивання та 1 раз водою дистильованою при відсутності режиму «overflow», додаючи в кожен лунку не менше 400 мкл рідини. Час між заповненням і аспірацією (замочування) повинно бути не менше 30 сек.

### Рекомендується використовувати:

- Режим відмивання з переповненням - «overflow» - з внесенням в лунки по 600-700 мкл робочого розчину для

промивання;

- Поперечну аспірацію розчину з лунок - режим «crosswise».

Необхідно стежити за повною аспірацією після кожного циклу відмивання (залишковий обсяг в лунках не повинен перевищувати 10 мкл).

5. У всі лунки внести по 100 мкл субстратної-індикаторного розчину, негайно помістити планшет в захищене від світла місце і витримати 25 хв при кімнатній температурі в захищеному від світла місці або в термостаті при температурі 37 оС протягом 20 хв. Планшет кришкою не закривати!

6. В усі лунки (у тій же послідовності, з якою вносилися субстратно-індикаторний розчин) внести по 100 мкл стоп-реагенту, обережно (постукуванням по планшету) перемішати вміст лунок і приступити до реєстрації результатів (ОГ реакційної суміші після внесення стоп-реагенту стабільна не більше 10 хв).

#### Реєстрація та облік результатів

Результати ІФА реєструвати спектрофотометрично, вимірюючи оптичну густину (ОГ) при двох довжинах хвиль - 450 нм і 620-650 нм. При відсутності референс-фільтра на 620-650 нм оптичну густину (ОГ) вимірювати при довжині хвилі 450 нм, а виведення спектрофотометра на нульовий рівень ("бланк") здійснювати по повітрю.

Результати ІФА враховувати тільки при виконанні наступних умов:

середнє значення оптичної густини (ОГ) в лунках з К + не менш, ніж в 4 рази перевищує

середнє значення ОГ в лунках з К-;

середнє значення ОГ в лунках з К-(ОГК-ср) не більше 0,150;

середнє значення ОГ в лунках з К + сл більше критичної величини оптичної густини (ОГкрит), яка визначається за формулою:

$$\text{ОГкрит} = \text{ОГК-ср} + 0,04.$$

В іншому випадку дослідження необхідно повторити.

Досліджуваний зразок вважати позитивним, якщо ОГ в лунці з ним більше або дорівнює ОГкрит.

Досліджуваний зразок вважати негативним, якщо ОГ в лунці з ним менше ОГкрит.

Всі позитивні при первинному обстеженні зразки повинні бути досліджені за допомогою підтверджує тесту (рекомендується використання комплекту «НВsAg- підтверджуючий- БЕСТ»).

#### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ ТА ТРАНСПОРТУВАННЯ

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:*

04210, м. Київ-210, а/с 119,

тел.: (044) 536-03-23

тел./факс: (044) 536-03-53

E-mail: info@bestdiagnostic.com.ua

Виробник залишає за собою право вразі вдосконалення набору вносити зміни до інструкції.

#### КОРОТКА СХЕМА ПОСТАНОВКИ «НВsAg-БЕСТ»

<b>Використовувати тільки після ретельного ознайомлення з інструкцією!</b>	
<b>Внести</b>	В лунку А1 — 100 мкл К +; в лунку В1 — 100 мкл К + сл; в лунки С1, D1, Е1- по 100 мкл К-; в інші лунки планшета - по 100 мкл досліджуваних зразків
<b>Внести</b>	в усі лунки по 50 мкл робочого розведення кон'югату
<b>Інкубація</b>	1 год 15 хв при 44 С на шейкері (500 об/хв), або 2 год при 44 С в термостаті, або 2 год. при 37 С на шейкері (500 об/хв). Допускається використовувати також такі режими інкубації (зі зниженням чутливості тест-системи до 0,1 МО/мл): 1 год при 44 С на шейкері (500 об/хв), або 1 год 30 хв при 37 С на шейкері (500 об/хв), або 2 год при 37 С в термостаті
<b>Промити</b>	В режимі "Overflow" — 5 разів ФСБ-Т і 1 раз водою очищеною без режиму "Overflow" - 7 разів ФСБ-Т і 1 раз водою очищеною
<b>Внести</b>	По 100 мкл субстратної-індикаторного розчину в кожен лунку
<b>Інкубація</b>	25 хв., 18-25 °С, чи 20 хв., 37 °С
<b>Внести</b>	по 100 мкл стоп-реагенту в кожен лунку
<b>Виміряти</b>	ОГ при 450 нм (референс 620-650 нм), «бланк» - по повітрю