

## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению набора реагентов для  
выявления HBs-антигена

с использованием рекомбинантного  
антигена и моноклональных антител

«Гепаскан HBsAg»

(комплект А)

**ФСР 2008/03732**

**Е-0356**  
**Гепаскан HBsAg**  
**КОМПЛЕКТ А**

Настоящая инструкция распространяется на комплект А набора реагентов «Гепаскан HBsAg» для выявления HBs-антигена с использованием рекомбинантного антигена и моноклональных антител, включающий следующие компоненты:

**иммуносорбент** - моноклональные антитела мыши к HBs-антигену, иммобилизованные в лунках полистиролового или полихлорвинилового планшета для иммунологических реакций;

**положительный контрольный образец  $K^+$**  - сыворотка крови человека инактивированная, с добавленным рекомбинантным HBs-антигеном, не содержащая натурального HBsAg, антител к ВИЧ1, ВИЧ2, вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ1;

**отрицательный контрольный образец  $K^-$**  - сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая HBs-антигена, антител к ВИЧ1, ВИЧ2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ1;

$K^+$  и  $K^-$  - прозрачные или опалесцирующие жидкости желтоватого цвета;

**слабоположительный контрольный образец  $K^+_{с}$**  - сыворотка крови человека, инактивированная, не содержащая антител к ВИЧ1, ВИЧ2, к вирусу гепатита С, антигена р24 ВИЧ1, оттитрованная по ОСО HBsAg ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора: аморфный порошок или таблетка белого цвета с желтоватым оттенком, гигроскопична;

**конъюгат** - моноклональные антитела мыши к HBs-антигену, меченые пероксидазой хрена: прозрачная жидкость красного цвета;

**концентрат (25×) раствора № 1 для промывки планшетов** (концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином): прозрачная или опалесцирующая бесцветная пенящаяся жидкость; при хранении возможно расслоение и выпадение кристаллического осадка, растворяющегося при температуре от 35 до 37°C в течение 30 мин;

**раствор для разведения конъюгата:** прозрачная бесцветная пенящаяся жидкость; при хранении возможно выпадение осадка, растворяющегося при температуре от 35 до 37°C в течение 30 мин;

**хромоген ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин):** прозрачная бесцветная жидкость;

**субстратная буферная смесь с гидроперитом для разведения хромогена (БСГ):** прозрачная бесцветная жидкость;

**стоп-реагент:** прозрачная бесцветная жидкость.

Комплект А набора «Гепаскан HBsAg» выпускается в виде комплекта реагентов, упакованных в коробку. Комплект А набора рассчитан на проведение 192 анализов, включая контрольные.

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект А набора реагентов «Гепаскан HBsAg» предназначен для выявления HBs-антигена в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа.

Чувствительность определения HBs-антигена составляет 0,1 МЕ/мл.

## 2. СПОСОБ ПРИМЕНЕНИЯ

Исследования образцов в данном наборе реагентов проводятся одностадийным иммуноферментным «сэндвич» - методом.

Для проведения анализа используются образцы сыворотки или плазмы крови человека в объеме не менее 100 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Помните, что исследование образцов с выраженным гемолизом, гиперлипидемией, бактериальным проростом, а также длительно хранившихся без замораживания, может привести к получению ложных результатов.

В предлагаемом наборе реагентов не могут быть исследованы образцы, содержащие азид натрия в качестве консерванта.

Для исключения некорректных результатов исследуемые образцы необходимо готовить и хранить в условиях, предотвращающих бактериальный пророст. Следует осветлять образцы сывороток, содержащие агрегаты и осадок, центрифугированием.

Собранные образцы сывороток или плазмы хранят при температуре от 4 до 6 °С. Если образцы не могут быть протестированы в течение 72 ч, их следует хранить при температуре не выше минус 15°С. При этом рекомендуется замораживать и оттаивать образцы не более одного раза.

Нельзя использовать компоненты из наборов разных серий.

Анализ проб следует проводить так, чтобы на каждого оператора одновременно приходилось не более двух планшетов.

Каждый образец сыворотки или буферный раствор необходимо отбирать новым наконечником.

Со всеми тестируемыми образцами, отработанными растворами, а также с оборудованием и материалами, находящимися с ними в контакте, следует обращаться как с инфицированными объектами:

- все отработанные растворы обезвреживать 4 % раствором хлорамина или 6 %-м раствором перекиси водорода при комнатной температуре в течение 3 ч;
- все твердые отходы сбрасывать в специальный контейнер с пломбируемой крышкой и подвергать автоклавированию;
- инструменты и оборудование до и после работы протирать 70 % спиртом.

Для анализа дополнительно требуются следующие материалы и оборудование:

- дистиллированная или деионизованная вода;
- резиновые перчатки;
- хлорамин или перекись водорода для обеззараживания;
- спирт этиловый;
- пипетки одноканальные автоматические вместимостью от 5 мкл до 1000 мкл;

- пипетки 12-ти (8-канальные) вместимостью от 5 мкл до 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 250 мкл;
- наконечники полипропиленовые вместимостью 1000 мкл;
- центрифуга настольная на  $(3-10) \times 10^3$  об/мин;
- пробирки центрифужные полипропиленовые вместимостью (1,5-2,2) мл для хранения и осветления образцов сыворотки;
- мерные стаканы или цилиндры вместимостью 250 мл и 500 мл;
- воздушный термостат на 37 °С;
- аппарат для промывания планшетов;
- встряхиватель для планшетов;
- спектрофотометр для измерения оптического поглощения в лунках планшета при двух длинах волн 450 нм и 620-680 нм или при длине волны 450 нм;
- контейнер для сброса твердых отходов;
- автоклав для инактивации отходов;
- контейнер для слива отработанных жидкостей;
- вата гигроскопическая;
- фильтровальная бумага.

### 3. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ (для реакции на одном планшете)

Перед началом работы компоненты набора выдержите при комнатной температуре в течение 30-35 мин (все реагенты, которые будут использованы для текущего анализа, должны иметь комнатную температуру!)

Испытуемые образцы сывороток или плазмы крови осветлите центрифугированием.

Условия и сроки хранения компонентов набора после вскрытия индивидуальной упаковки приведены в Таблице № 1.

Таблица 1. Условия и сроки хранения компонентов.

Компонент набора	Условия хранения	Срок хранения
Иммуносорбент	(2-8) °С в плотно закрытом пакете	8 недель
K <sup>+</sup>	(2-8) °С	8 недель
K <sup>-</sup>	(2-8) °С	8 недель
Конъюгат	(2-8) °С	8 недель
Концентрат раствора № 1	(2-8) °С	8 недель
Р-р для разведения конъюгата	(2-8) °С	8 недель
Хромоген ТМБ	(2-8) °С	8 недель
БСГ	(2-8) °С	8 недель
Стоп-реагент	(2-8) °С	До окончания срока годности набора

#### 3.1. Раствор № 1 для промывки планшетов

Содержимое флакона с концентратом 25х раствора № 1 интенсивно встряхните. При выпадении в концентрате кристаллов прогрейте при температуре от 35 до 37 °С до полного растворения.

Отберите 12 мл раствора № 1 и разведите его дистиллированной водой до метки 300 мл, перемешайте.

Храните не более 48 ч при температуре от 4 до 25°C.

### **3.2. Рабочее разведение конъюгата**

В случае выпадения осадка флакон с раствором для разведения конъюгата выдержите при температуре от 35 до 37°C в течение 30 мин до полного растворения осадка и интенсивно встряхните.

Непосредственно перед проведением анализа приготовьте рабочее разведение конъюгата: 1,5 мл конъюгата смешайте с 1,5 мл раствора для разведения конъюгата. Тщательно перемешайте.

Храните не более 2 ч при комнатной температуре.

### **3.3. Рабочее разведение хромогена**

За 5-10 мин до окончания иммунологической реакции приготовьте рабочее разведение хромогена: 1 мл хромогена смешайте с 10 мл БСГ. Тщательно перемешайте.

Храните не более 20 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте.

**ВНИМАНИЕ!** Посуду и наконечники пипеток, контактирующие с раствором хромогена, использовать однократно, так как даже следы синтетических моющих средств приводят к неконтролируемому разложению ТМБ в ходе пероксидазной реакции.

Не следует использовать фольгу для прикрывания флаконов с раствором хромогена из-за нежелательности контакта раствора хромогена с металлом.

### **3.4. Контрольный образец $K^+_c$**

Непосредственно перед использованием во флакон с  $K^+_c$  добавьте \_\_\_\_ мл дистиллированной воды для серии набора №\_\_\_\_, осторожно перемешайте и выдержите 5-10 мин при комнатной температуре.

Храните не более 4 ч при комнатной температуре.

## **4. ПРОВЕДЕНИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

Иммуносорбент (планшет для иммунологических реакций с иммобилизованными антителами) готов к использованию.

### **4.1. Порядок внесения исследуемых и контрольных образцов сывороток**

В три лунки внесите по 100 мкл  $K^-$ , в одну лунку внесите 100 мкл  $K^+$ , в две лунки по 100 мкл  $K^+_c$  (см. п.3.4), в остальные лунки внесите по 100 мкл исследуемых сывороток.

Во все лунки планшета внесите по 25 мкл рабочего разведения конъюгата. Содержимое лунок перемешайте осторожным постукиванием по краю рамки, не допуская смешивания содержимого разных лунок. Планшет заклейте пленкой (или закройте крышкой) и выдержите либо 2 ч при температуре  $(42,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ , либо 2 ч с использованием встряхивателя (500 об/мин) при температуре  $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ .

### **4.2. Промывание планшетов**

**ВНИМАНИЕ!** Неполное промывание лунок планшетов может привести к получению ложных результатов.

Удалите жидкость из лунок с помощью промывателя. Промойте планшет 5-кратно раствором № 1, внося в лунки по 250 мкл промывающего раствора и выдерживая его в лунках не менее 20 сек. После промывания тщательно удалите влагу из лунок планшета, постукивая им по фильтровальной бумаге, положенной на полиэтиленовую пленку.

4.3. Во все лунки планшета внесите по 100 мкл рабочего разведения хромогена (см. п. 3.3). Планшет поместите в защищенное от света место на  $(25 \pm 2)$  мин при температуре от 18 до 25°C.

Не располагайте планшеты стопкой!

4.4. Остановите пероксидазную реакцию путем внесения во все лунки по 100 мкл стоп-реагента и немедленно проведите учет результатов.

## 5. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерение оптической плотности (ОП) проводите при двух длинах волн 450 нм и 620-680 нм. Допускается учет результатов при одной длине волны 450 нм. Выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк») осуществляйте по воздуху.

Результаты измерения ОП для контрольных образцов должны соответствовать требованиям пунктов 5.1 - 5.3.

5.1. Значение ОП  $K^+$  должно быть не меньше 0,60 оптических единиц (о.е.);

5.2. Должно быть не менее двух значений ОП  $K^-$ , удовлетворяющих условиям:

а) быть меньше 0,15 о.е.;

б) превышать не более чем в 1,5 раза наименьшее из значений ОП  $K^-$ .

5.3. Среднее значение ОП в лунках с  $K^+$  должно превышать ОП<sub>КРИТ</sub>, которое вычисляют по формуле:

$ОП_{КРИТ} = ОП_{СР}(K^-) + 0,05$ , где  $ОП_{СР}(K^-)$  - среднее арифметическое всех (двух или трех) значений ОП  $K^-$ , удовлетворяющих условиям п. 5.2.

Если хотя бы одно из требований пп. 5.1 - 5.3 не выполняется, всё исследование необходимо повторить, обращая особое внимание на тщательное промывание планшетов (п. 4.3).

Результат исследования образца считается положительным, если соответствующая ему ОП больше или равна ОП<sub>КРИТ</sub>.

Результат исследования образца считается отрицательным, если соответствующая ему ОП меньше ОП<sub>КРИТ</sub>.

## 6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отрицательный результат показывает, что тестируемый образец не содержит HBs-антигена или содержит HBs-антиген в количестве, находящемся ниже уровня чувствительности набора реагентов «Гепаскан HBsAg».

Образцы, которые при первоначальном тестировании дали положительный результат, следует протестировать повторно не менее чем в двух лунках.

Образцы, которые при повторном тестировании не выявляются как положительные, следует считать отрицательными.

Невоспроизводимый положительный результат может быть обусловлен следующими техническими проблемами:

- а) внесение образцов загрязненными наконечниками;
- б) перекрестной контаминацией образцов в процессе отмывки или раскапывания сывороток;
- в) неполным удалением реакционной смеси или промывающего раствора со дна лунок;
- г) контаминацией субстрата ионами металлов.

Если хотя бы один из двух повторных результатов окажется положительным, образец рассматривают как содержащий HBs-антиген или неспецифически реагирующие агенты.

Для подтверждения положительного результата анализа или выявления неспецифически реагирующих ложноположительных образцов необходимо воспользоваться комплектом «Подтверждающий тест» набора «Гепаскан HBsAg», работающим по принципу конкурентного иммуноферментного анализа.

## 7. ФОРМА ВЫПУСКА

Комплект А набора «Гепаскан HBsAg» выпускается в виде следующих реагентов, упакованных в коробку:

Компонент	Описание	Кол-во
Иммуносорбент	разборный или цельный планшет, в пакете	2 шт.
K <sup>+</sup>	1,0 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
K <sup>-</sup>	1 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
K <sup>+</sup> <sub>c</sub>	от 0,5 до 1,5 мл во флаконе (лиофилизированный)	2 шт.
Конъюгат	3,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Концентрат раствора №1	25 мл во флаконе	1 шт.
Р-р для разведения конъюгата	3,5 мл в пластиковой пробирке	1 шт.
Хромоген ТМБ	1,5 мл в пластиковой пробирке	2 шт.
БСГ	21 мл во флаконе	1 шт.
Стоп-реагент	25 мл во флаконе	1 шт.

## 8. СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора 12 месяцев. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Наборы хранят согласно СП 3.3.2.1248-03 в сухом, защищенном от света и недоступном для детей месте при температуре от 2°С до 8°С. Замораживание не допускается.

Транспортировка осуществляют согласно СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°С до 8°С. Замораживание не допускается. Допускается транспортировка в течение 3 суток при температуре от 9°С до 30°С.