

## ІНСТРУКЦІЯ ПРО ВИКОРИСТАННЯ

### DIA-C-HBV

тест-система імуноферментна  
для підтвердження наявності  
поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg)

Набір Т6

T-0705

#### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) в зразках сироваток та плазми крові людини після первинного скринінгу методом імуноферментно-го аналізу.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Тест-система являє собою набір, що включає наступні компоненти: *імуносорбент* – полістироловий планшет, в лунках якого сорбовані моноклональні антитіла до поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg); *концентрат кон'югату* – моноклональні антитіла до HBsAg, кон'юговані з пероксидазою хрому; *позитивний контроль* – інактивована сироватка крові людини, яка містить HBsAg; *негативний контроль* – сироватка крові людини, яка не містить поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg), а також антитіла до ВІЛ, вірусу гепатиту С і *Теропета pallidum*; *нейтралізаційний компонент* – моноклональні антитіла до HBsAg; *концентрат розчину для промивання* – концентрат фосфатно-сольового буферу, містить детергент; *розчин для розведення сироваток* – фосфатно-сольовий буфер, що містить детергент, казеїнову фракцію білків молока, блок-компоненти, барвник і консерванти; *розчин для розведення кон'югату* – фосфатно-сольовий буфер, що містить детергент, блок-компоненти, барвник і консерванти; *субстратний буфер* – цитратно-фосфатний буфер, що містить перекис водню; *хромоген* – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) в розчині; *стоп-реагент* – розчин сірчаної кислоти.

Зовнішній вигляд компонентів: *імуносорбент* – планшет, що складається з 6 стрипів по 16 лунок; *концентрат кон'югату* – блакитна з незначною опалесценцією рідина; *позитивний та негативний контроль* – світло-жовті з незначною опалесценцією рідини; *нейтралізаційний компонент* – безбарвна з незначною опалесценцією рідина; *концентрат розчину для промивання* – безбарвна опалесцююча рідина, допускається розшарування та випадіння кристалічного осаду, що розчинюється при нагріванні; *розчин для розведення сироваток* – фіолетова опалесцююча рідина; *розчин для розведення кон'югату* – червона опалесцююча рідина; *субстратний буфер, розчин ТМБ, стоп-реагент* – прозорі безбарвні рідини.

Тест-система розрахована на проведення 96 аналізів, включаючи контроль, з можливістю використання планшетів постріпово на 6 постановок імуноферментного аналізу (6×32).

#### Принцип аналізу

Принцип аналізу DIA-C-HBV базується на принципі нейтралізації зв'язування кон'югату з поверхневим антигеном вірусу гепатиту В вільними антитілами нейтралізаційного компоненту.

При внесенні в лунки зразків досліджуваних сироваток та кон'югату, HBsAg у випадку його наявності, зв'язується як зі специфічними антитілами на твердій фазі, так і з антитілами кон'югату, утворюючи комплекси антиген-антитіло. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додають розчин проявника. Пероксидазну реакцію зупиняють, додаючи стоп-реагент, і вимірюють оптичну густину суміші у лунках (при довжині хвилі 450 нм), яка пропорційна концентрації HBsAg у зразках сироваток або плазми крові.

При внесенні в реакційне середовище нейтралізаційного компоненту відбувається інгібування утворення комплексу антиген-антитіло через зв'язування антигенних детермінант HBsAg моноклональними антитілами нейтралізаційного компоненту, що призводить до зниження оптичної густини забарвленого розчину в лунках.

#### СКЛАД НАБОРУ

N	Назва компоненту	Кількість
1	Імуносорбент	2 планшети (12×16)
2	Концентрат кон'югату (11х)	1 амп. × 1,35 мл
3	Позитивний контроль	1 амп. × 1,5 мл
4	Негативний контроль	2 амп. × 1,5 мл
5	Нейтралізаційний компонент	1 амп. × 0,35 мл

N	Назва компоненту	Кількість
6	Концентрат розчину для промивання (31х)	2 фл. × 25 мл
7	Розчин для розведення сироваток	1 фл. × 20 мл
8	Розчин для розведення кон'югату	1 фл. × 15 мл
9	Субстратний буфер	1 фл. × 14 мл
10	Розчин ТМБ	1 фл. × 14 мл
11	Стоп-реагент	1 фл. × 25 мл
12	Клейка плівка	6 шт.

#### СПОСІБ ВИКОРИСТАННЯ

##### Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- вода дистильована;
- перекис водню, 6 %;
- спирт етиловий, 70°;
- вата гігроскопічна;
- фільтрувальний папір;
- піпетки одноканальні (5-40, 20-200, 200-1000 мкл) та наконечники до них;
- піпетки 8-канальні (50-300 мкл) та наконечники до них;
- мірна склянка або циліндр (1000 мл);
- ванночки для реагентів;
- флакони для реактивів, 20 мл;
- сухоповітряний термостат;
- апарат для промивання планшетів (вошер);
- фотометр для вимірювання оптичної густини в планшетах;
- контейнер для збирання твердих забруднених відходів;
- контейнер для зливу забруднених рідин.

##### Необхідні застереження

- Заходи безпеки при застосуванні набору:
- роботу проводити в спеціально обладнаному приміщенні;
  - працювати в гумових рукавичках;
  - не піпетувати розчини ротом;
  - всі стічні розчини обробляти 6 % розчином перекису водню при кімнатній температурі протягом 3 годин;
  - всі тверді відходи збирати в спеціальний контейнер, автоклавувати протягом 1 години при температурі 120°С;
  - інструменти, обладнання, а також робочі поверхні протирати 70° етиловим спиртом.

##### Правила роботи з тест-системою:

- не використовувати набір після закінчення терміну придатності, не змішувати компоненти наборів різних серій;
- ретельно перемішувати реагенти при підготовці та проведенні аналізу;
- використовувати вимитий та сполоснутий дистильованою водою посуд для приготування реагентів;
- не допускати підсихання лунок на всіх етапах постановки ІФА;
- перевіряти точність дозування, слідкувати за робочим станом піпеток та іншого обладнання;
- уникати попадання прямих сонячних променів на робочу поверхню під час проведення аналізу.

##### Вимоги до промивання планшету:

- неякісне промивання планшету призводить до одержання некоректних результатів;
- для промивання планшету рекомендується використовувати автоматичний промивач - вошер; у випадку відсутності вошера чи його поганої роботи можна промивати лунки 8-канальною піпеткою;
- на всіх етапах промивання необхідно контролювати заповнення лунок і повну аспірацію (видалення) рідини з них: лунки повинні заповнюватись повністю (350 мкл в лунку), без переповнення та перетікання рідини з сусідніх лунок.

##### Підготовка зразків

Зразки сироваток чи плазми крові зберігають при температурі 2-8°С не більше 72 годин. Допускається заморожування зразків (бажано до температури нижче -20°С) не більше двох разів. Необхідно освітлювати зразки сироваток (плазми), які містять агрегати та осад, за допомогою центрифугування.

Зразки з азидом натрію, гемолізом, гіперліпідемією або бактеріальним проростанням не придатні для аналізу.

##### Проведення аналізу

##### 1 Підготовка до аналізу (з розрахунку на 32 лунки)

Витримують компоненти набору при температурі 18-25°С протягом 30 хвилин.

##### 1.1 Приготування розчину для промивання

Вміст одного флакону концентрату розчину для промивання інтенсивно потрушують. Відбирають 8 мл розчину і розводять в 240 мл дистильованої води, перемішують. Якщо концентрат розчину містить кристали, його прогрівають перед використанням при 35-37°С до повного розчинення кристалів.

Розчин можна зберігати при температурі 2-8°С не більше 10 діб.

### 1.2 Приготування розчину кон'югату

В чистий флакон відбирають 2 мл розчину для розведення кон'югату та додають 200 мкл концентрату кон'югату. Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

### 1.3 Приготування розчину кон'югату з нейтралізаційним компонентом

В чистий флакон відбирають 1 мл розчину кон'югату, приготованого згідно п.1.2, та додають 50 мкл нейтралізаційного компонента (НК). Вміст флакону ретельно перемішують, не допускаючи піноутворення.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

### 1.4 Приготування розчину ТМБ субстрату

В чистий флакон відбирають 2 мл хромогену ТМБ і додають 2 мл субстратного буфера, суміш інтенсивно потрушують.

Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин ТМБ субстрату необхідно захищати від попадання прямого світла та контакту з металами або іонами металів. Перед використанням розчин ТМБ субстрату повинен бути безбарвним.

## 2 Проведення аналізу

- Готують розчин для промивання згідно п. 1.1.
- Звільняють необхідну кількість стрипів від упаковки, вставляють їх в рамку.

*Невикористані стрипи необхідно щільно закрити в пакеті та використати протягом одного місяця. Невикористані стрипи зберігають при температурі 2-8 °С.*

- В лунки А1, А2 вносять по 100 мкл позитивного контролю, а в лунки В1, В2 - по 90 мкл розчину для розведення сироваток та 10 мкл позитивного контролю (розведення 1:10). В чотири лунки С1, С2, D1, D2 вносять по 100 мкл негативного контролю.
- По 100 мкл досліджуваних зразків сироваток вносять в лунки згідно схеми.

	1	2	3	4
A	K+	K+	№ 5	№ 5
B	K+ (1:10)	K+ (1:10)	№ 6	№ 6
C	K-	K-	№ 7	№ 7
D	K-	K-	№ 8	№ 8
E	№ 1	№ 1	№ 9	№ 9
F	№ 2	№ 2	№ 10	№ 10
G	№ 3	№ 3	№ 11	№ 11
H	№ 4	№ 4	№ 12	№ 12
Розчин кон'югату без НК				
Розчин кон'югату з НК				

- Зразки з високою концентрацією HBsAg (ОГ>1,0), якщо вони не розведені, можуть не нейтралізуватися нейтралізаційним компонентом. Такі зразки слід розводити 1:10, 1:100 або більше розчином для розведення сироваток.
- Готують розчин кон'югату згідно п. 1.2.
- Готують розчин кон'югату з нейтралізаційним компонентом згідно п. 1.3.
- Витримують планшет при 18-25 °С протягом 10 хвилин та додають в кожну лунку непарних (незабарвлених на схемі) рядів поверх досліджуваних та контрольних зразків сироваток по 50 мкл розчину кон'югату, а в лунки парних (забарвлених на схемі) – по 50 мкл розчину кон'югату з нейтралізаційним компонентом. По закінченні внесення кон'югату встановлюють планшет на автоматичний потрушувач та перемішують вміст лунок (при малій амплітуді потрушування) протягом 15-20 сек.
- Накривають планшет клейкою плівкою або кришкою та інкубують при температурі 42 °С протягом 2 годин.
- По закінченні інкубації видаляють вміст лунок за допомогою промивача або 8-канальної піпетки та промивають лунки вісім разів розчином для промивання з експозицією розчину в лунках протягом 40-60 секунд для кожного циклу промивання, після чого позбавляються зайвої вологи (постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу).
- Готують розчин ТМБ субстрату згідно п. 1.4.
- Вносять в лунки по 100 мкл розчину ТМБ субстрату.
- Накривають планшет новою клейкою плівкою або кришкою та інкубують його при температурі 18-25 °С в темному місці протягом 30 хвилин.
- Зупиняють кольорову реакцію внесенням до всіх лунок по 100 мкл стоп-реагенту.
- Не більше як через 5 хвилин після закінчення кольорової реакції визначають оптичну густину (ОГ) у двоохвильовому режимі (450 нм відносно 620 нм).

ОГ можна визначити в однохвильовому режимі (450 нм) відносно порожньої лунки (бланк). Необхідно передбачити порожню лунку в планшеті при аналізі. При роботі в однохвильовому режимі знижується чутливість та точність аналізу.

## ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

- Розраховують середнє значення оптичної густини для лунок негативного контролю без НК (ОГсер К-).
- Проведення аналізу вважають коректним, якщо ОГсер К- не вище 0,1 оптичної одиниці (ОО), значення ОГ позитивного контролю (нативний) без НК не нижче 0,6 ОО та відсоток нейтралізації для позитивного контролю складає не менше 50 % при дослідженні нативного зразка або розведеного 1:10.
- Відсоток нейтралізації для позитивного контролю та для досліджуваних зразків розраховують за формулою:

$$\% \text{нейтралізації} = \frac{\text{ОГ (не нейтрал. зразка)} - \text{ОГ (нейтрал. зразка)}}{\text{ОГ (не нейтрал. зразка)} - \text{ОГсер К-}} \times 100\%$$

- Граничне значення ОГ (ГЗ). ГЗ розраховують, додаючи константну величину **0,06** до значення ОГсер К-.
- Результати аналізу вважаються **негативними**, якщо:
  - значення ОГ досліджуваного зразка менше ГЗ;
  - значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ, але відсоток нейтралізації складає менше 50 % хоча б для одного з його розведень.
- Результати аналізу вважаються **позитивними**, якщо значення ОГ досліджуваного зразка більше ГЗ, та відсоток нейтралізації складає не менше 50 % хоча б для одного з його розведень.

### Наприклад:

ОГ (не нейтрал. зразка) = 1,584, ОГ (нейтрал. зразка) = 0,245, ОГсер К- = 0,029.

$$\% \text{нейтралізації} = \frac{1,584 - 0,245}{1,584 - 0,029} \times 100\% = 86\% \text{ – позитивна сироватка}$$

ОГ (не нейтрал. зразка) = 0,250, ОГ (нейтрал. зразка) = 0,180, ОГсер К- = 0,029

$$\% \text{нейтралізації} = \frac{0,250 - 0,180}{0,250 - 0,029} \times 100\% = 31\% \text{ – негативна сироватка}$$

*Примітка: в зв'язку з тим, що в досліджуваних зразках можуть бути імунні комплекси, які в нативній сироватці можуть блокувати сайти зв'язування антигену, значення ОГ розведеної сироватки по відношенню до нативної може збільшуватися (феномен Деніша).*

## УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ І ТРАНСПОРТУВАННЯ

Набір зберігають і транспортують при температурі 2-8°C. Заморожувати набір не дозволяється.

## ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

Термін придатності набору – 1 рік.

## ФОРМА ВИПУСКУ – тест-набір.

Код АТС – V04CX.

## ПАКУВАННЯ

- Імуносорбент вкладений в пакет з багатощарової та комбінованої плівки; пакет термозапаяний.
- Кон'югат, позитивний контроль, негативний контроль, нейтралізаційний компонент розлиті в пластикові ампули об'ємом 0,5 мл або 2,0 мл.
- Розчини, крім розчину ТМБ, розлиті у пластмасові флакони об'ємом 30 мл або 35 мл.
- Розчин ТМБ розлитий у флакони з пластмаси коричневого кольору об'ємом 15 мл.
- Набір компонентів разом з інструкцією з використання поміщені в коробку з гофрокартону з пластиковою вставкою.

## ВИРОБНИК

АТЗТ НВК „Діапроф-Мед“, 04123, Україна, м. Київ, вул. Світлицького, 35.

За довідками звертайтеся по тел./факсу (044) 433-75-82, 433-02-22 або e-mail: tech@diagr.kiev.ua.

**Рекламації** на якість наборів надсилайте до ДП “Центр імунобіологічних препаратів” за адресою: 03038, Україна, м. Київ, вул. М. Амосова, 5, тел. (044) 275-24-66, 275-07-02 та підприємству-виробнику.

У випадку порушення умов зберігання, транспортування та схеми постановки ІФА з вини споживача рекламації розглядаються як необґрунтовані.