

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от «\_\_»\_\_ 20\_\_ г. №\_\_



Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Швырев М.В.

«22» ноября 2010г.

**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В  
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
(«ГепатитИФА-HBsAg»)**

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов «ГепатитИФА-HBsAg» предназначен для качественного и количественного определения поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В (HBV) в сыворотке и плазме крови человека.

**1.2.** Поверхностный антиген (HBsAg) представляет собой гликозилированный белок оболочки HBV и является важным маркером инфицирования. HBsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов вируса и дополнительные субдетерминанты (d и y), определяющие иммунологические различия подгрупп (ad и ay). В настоящее время это основной маркер при определении инфицирования вирусом гепатита В. HBV вызывает острый и хронический вирусный гепатит и чаще других вирусных гепатитов передается при переливании крови. Он вызывает целый спектр проявлений, варьирующих от мягкой, бессимптомной формы до молниеносного гепатита, серьезных поражений печени и цирроза. Кроме того, ясно доказана роль HBV в развитии первичного рака печени.

Количественное определение HBsAg в крови представляется целесообразным при корректировке диагноза и подборе лечения. При проведении скрининга на гепатит В достаточно качественного определения HBsAg в крови.

**1.3.** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

Комплектация на 96 определений рассчитана на количественный анализ в дубликатах 40 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 44 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на количественный анализ в дубликатах 80 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 88 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

**Обратите внимание,** что при количественном анализе определение оптических плотностей калибровочных проб и раствора ТМБ, а также определение концентрации контрольной сыворотки обязательно на каждом планшете.

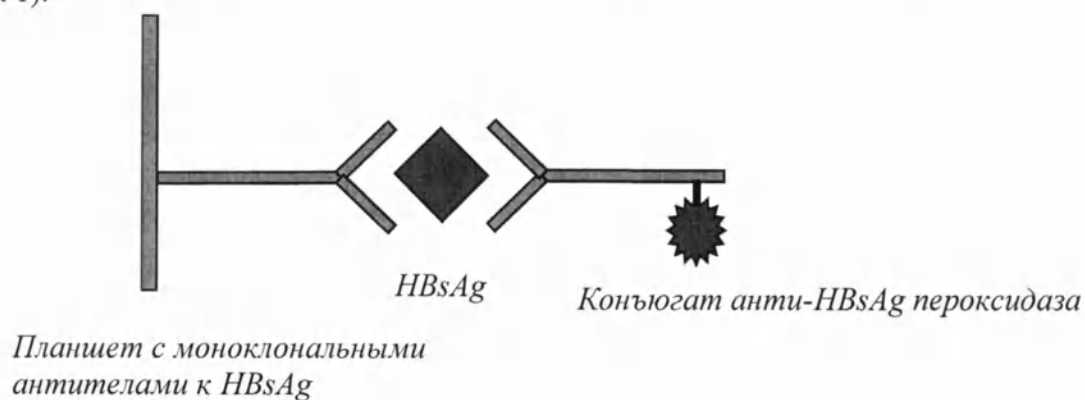
Обратите внимание, что при качественном анализе определение оптических плотностей калибровочной пробы №1 (отрицательный контроль), калибровочной пробы №2 (слабоположительный контроль), калибровочной пробы №6 (положительный контроль) и раствора ТМБ, обязательно на каждом планшете.

*Примечание:* в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-HBsAg» реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к HBsAg. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация HBsAg, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации HBsAg. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству HBsAg в исследуемом образце (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Схема анализа**

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация HBsAg в исследуемых образцах. Наличие HBsAg в случае проведения качественного анализа оценивается относительно значения, полученного делением оптической плотности КП №2 на 2 (ОП крит.).

### 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка или 2 упаковки, в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- калибровочные пробы (КП), аттестованные по международному стандарту на HBsAg NIBSC 00/588, содержащие известные количества HBsAg. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентрации HBsAg указаны на этикетках флаконов, ориентировочные: 0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 МЕ/мл; 6 флаконов (по 1 мл) (лиофилизированные препараты или жидкости) (см. таблицу 1);

- конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» - 1 флакон (8 мл) или 1 флакон (16 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 флакон (6 мл) или 1 флакон (12 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» - 1 флакон (50 мл) или 2 флакона (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- контрольная сыворотка с известным содержанием HBsAg, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (1 мл) (лиофилизированный препарат или жидкость) (см. таблицу 1);

- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт. или 2 шт. в зависимости от комплектации (см. таблицу 1).



Таблица 1. Варианты комплектации

| Название компонента                                                    | 96 определений    | 192 определения      |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Комплект стрипов                                                       | 1 комплект        | 2 комплекта          |
| Комплект калибровочных проб                                            | 1 комплект - 1 мл | 1 комплект - 1 мл    |
| Контрольная сыворотка                                                  | 1 флакон - 1 мл   | 1 флакон - 1 мл      |
| Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза                                        | 1 флакон - 8 мл   | 1 флакон - 16 мл     |
| Аналитический водно-солевой раствор                                    | 1 флакон - 6 мл   | 1 флакон - 12мл      |
| Водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови | 1 флакон - 50 мл  | 2 флакона – по 50 мл |
| Концентрированный буферный раствор для промывки лунок                  | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Раствор ТМБ                                                            | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона – по 14 мл |
| Стоп-реагент                                                           | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Прозрачный пластиковый пакет с замком                                  | 1 шт.             | 2 шт.                |

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1.** Диагностическая специфичность набора определялась на 200 отрицательных сыворотках крови человека, и составила 99,5%.

**3.2.** Диагностическая чувствительность определялась на 100 положительных сыворотках крови человека, и составила 100%.

**3.3.** Коэффициент вариации результатов определения HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg» не превышает 8%.

**3.4.** Линейность. Зависимость концентрации HBsAg в анализируемых образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №3 - №6 и составляет 90-110%.

**3.5.** Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» HBsAg – проверка соответствия значения определяемой концентрации HBsAg расчётной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КП№3. Процент открытия составляет 90–110%.

**3.6.** Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация HBsAg по ОСО42-28-311-00 в анализируемом образце не превышает 0,05 МЕ/мл.

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50–1000 мл;

- стакан стеклянный подходящего объема;

- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

- контейнер для дезинфекции;

- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.



## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

**6.1.** Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

**6.2.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

**6.3.** Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка реагентов

**7.1.1.** Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

**7.1.2.** Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

**7.1.3.** Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,66 мл.

**7.1.4.** Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

**7.1.5.** Буфер А готов к использованию. Расход Буфера А на один стрип составляет 0,5 мл.

**7.1.6.** Буфер Д готов к использованию.

**7.1.7.** Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

**7.1.8.** Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

**7.1.9.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В Приложениях 1 и 2 приведены схемы проведения количественного и качественного анализов, соответственно.

**7.1.10.** Разведение исследуемых образцов крови. Если концентрация HBsAg в исследуемых образцах по предварительным данным выше 5 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 1000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл буфера Д + 30 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

## **7.2. Постановка анализа**

**7.2.1.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

**7.2.1.1.** Количественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
 B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;  
 C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;  
 D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;  
 E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;  
 F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;  
 G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;  
 H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

**7.2.1.2.** Качественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
 B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1 (отрицательный контроль);  
 C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2 (слабоположительный контроль);  
 D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №6 (положительный контроль).

**7.2.2.** Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 25 мкл аналитического буфера.

**7.2.3.** Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

**7.2.4.** Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.



**7.2.5.** Не удаляя содержимого лунок, во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза.

**7.2.6.** Инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.7.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

**7.2.8.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

**7.2.9.** Инкубировать стрипы в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.10.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

**7.2.11.** Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 20 минут при температуре +18...25°C.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов необходимо вычитать величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

*Примечание:* среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 9.1. Количественный анализ

**9.1.1.** Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации HBsAg в калибровочных пробах (МЕ/мл) (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

*Примечание 1:* для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать программное обеспечение «ИФА Мастер».

*Примечание 2:* для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$



где  $B$  – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

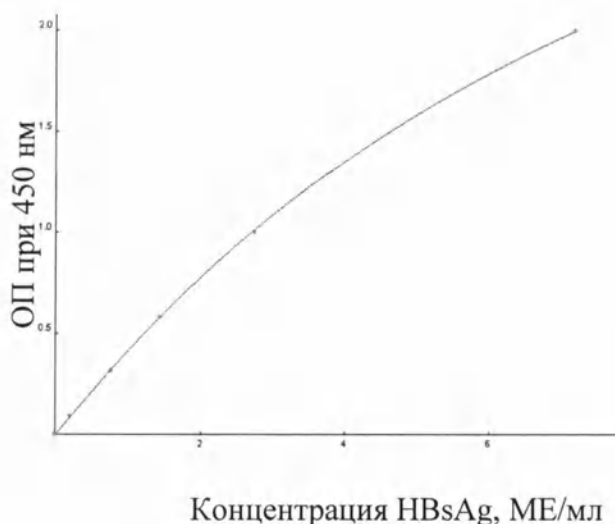
$B_T$  – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок  $A1$  и  $A2$ .

Определить содержание HBsAg в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию HBsAg умножить на фактор разведения.

**9.1.2.** Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации HBsAg, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6». Для точного определения концентрации необходимо выполнить разведение образцов в соответствии с п. 7.1.10.

**9.1.3.** Образцы с концентрацией ниже 0,05 МЕ/мл признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с концентрацией выше или равной 0,05 МЕ/мл должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.



**Рисунок 2. Типичный калибровочный график**

*Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!*

## 9.2. Качественный анализ

Для вычисления ОП<sub>крит.</sub> оптическую плотность КП №2 разделить на 2.

Образцы с оптической плотностью (ОП) ниже ОП<sub>крит.</sub> признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с ОП равной или выше ОП<sub>крит.</sub> должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**10.1.** Набор «ГепатитИФА-НВsAg» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

**10.2.** Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

**10.3.** В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- буфер Д, конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

**10.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4°эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого количественного анализа необходимо построение калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации НВsAg в контрольной сыворотке;
- для каждого независимого качественного анализа необходимо определение ОП КП№1, КП№2, КП№6 и расчёт ОП крит.;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

**10.5.** Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

**10.6.** Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.



10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-НВsAg» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор  
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем  
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

Главный врач ГКДЦ (вирусологический)



Вашукова С.С.

| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                                | Температура          | Время                                               | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                        | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15' | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП и КС                                                         |                      |                                                     |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                            |                      |                                                     |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                       | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок,<br>50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза |                      |                                                     | Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                       | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                         |                      |                                                     | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+ 266 мл H <sub>2</sub> O           |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                             |                      |                                                     |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                       | +37°C                | 10'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реактива                                                   |                      |                                                     |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                         | КТ                   | 1 – 2'                                              | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                       |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции    | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                         |                      |                                                     | Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО                       |

Примечания:

КП – калибровочная проба; КС – контрольная сыворотка; ОП – оптическая плотность;

КТ – комнатная температура (+18...25°C); ПО – программное обеспечение



| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                             | Температура          | Время                                            | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                     | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'  | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП 1; КП2; КП6                                               |                      |                                                  |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                         |                      |                                                  |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок, 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза |                      |                                                  | Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                      |                      |                                                  | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H <sub>2</sub> O          |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                          |                      |                                                  |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                    | +37°C                | 10'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реагента                                                |                      |                                                  |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                      | КТ                   | 1 – 2'                                           | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                    |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                      |                      |                                                  | Калькулятор                                                               |

Примечания: КП – калибровочная проба; ОП – оптическая плотность; КТ – комнатная температура (+18...25°C).

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от «\_\_» \_\_\_\_ 20\_\_ г. № \_\_\_\_



Генеральный директор

ООО «Компания Алкор Био»

Ильириев М.В.

«22» ноября 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В**  
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
(«ГепатитИФА-НВsAg»)

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов «ГепатитИФА-НВsAg» предназначен для качественного и количественного определения поверхностного антигена (НВsAg) вируса гепатита В (НВV) в сыворотке и плазме крови человека.

**1.2.** Поверхностный антиген (НВsAg) представляет собой гликозилированный белок оболочки НВV и является важным маркером инфицирования. НВsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов вируса и дополнительные субдетерминанты (d и у), определяющие иммунологические различия подгрупп (ad и ау). В настоящее время это основной маркер при определении инфицирования вирусом гепатита В. НВV вызывает острый и хронический вирусный гепатит и чаще других вирусных гепатитов передается при переливании крови. Он вызывает целый спектр проявлений, варьирующих от мягкой, бессимптомной формы до молниеносного гепатита, серьезных поражений печени и цирроза. Кроме того, ясно доказана роль НВV в развитии первичного рака печени.

Количественное определение НВsAg в крови представляется целесообразным при корректировке диагноза и подборе лечения. При проведении скрининга на гепатит В достаточно качественного определения НВsAg в крови.

**1.3.** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

Комплектация на 96 определений рассчитана на количественный анализ в дубликатах 40 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 44 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на количественный анализ в дубликатах 80 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 88 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

**Обратите внимание,** что при количественном анализе определение оптических плотностей калибровочных проб и раствора ТМБ, а также определение концентрации контрольной сыворотки обязательно на каждом планшете.

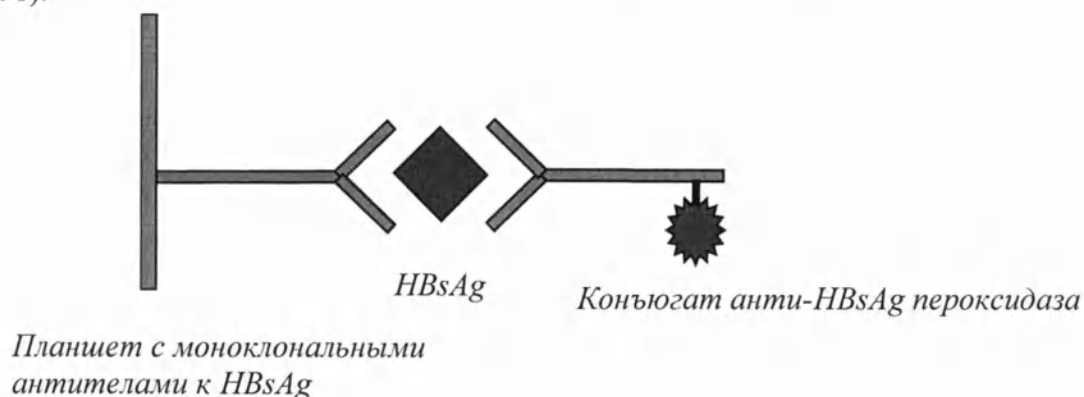
Обратите внимание, что при качественном анализе определение оптических плотностей калибровочной пробы №1 (отрицательный контроль), калибровочной пробы №2 (слабоположительный контроль), калибровочной пробы №6 (положительный контроль) и раствора ТМБ, обязательно на каждом планшете.

*Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-HBsAg» реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к HBsAg. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация HBsAg, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации HBsAg. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству HBsAg в исследуемом образце (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Схема анализа**

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация HBsAg в исследуемых образцах. Наличие HBsAg в случае проведения качественного анализа оценивается относительно значения, полученного делением оптической плотности КП №2 на 2 (ОП крит.).

### 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка или 2 упаковки, в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);



- калибровочные пробы (КП), аттестованные по международному стандарту на HBsAg NIBSC 00/588, содержащие известные количества HBsAg. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентрации HBsAg указаны на этикетках флаконов, ориентировочные: 0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 МЕ/мл; 6 флаконов (по 1 мл) (лиофилизированные препараты или жидкости) (см. таблицу 1);

- конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» - 1 флакон (8 мл) или 1 флакон (16 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 флакон (6 мл) или 1 флакон (12 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» - 1 флакон (50 мл) или 2 флакона (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

- контрольная сыворотка с известным содержанием HBsAg, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (1 мл) (лиофилизированный препарат или жидкость) (см. таблицу 1);

- прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт. или 2 шт. в зависимости от комплектации (см. таблицу 1).

Таблица 1. Варианты комплектации

| Название компонента                                                    | 96 определений    | 192 определения      |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Комплект стрипов                                                       | 1 комплект        | 2 комплекта          |
| Комплект калибровочных проб                                            | 1 комплект - 1 мл | 1 комплект - 1 мл    |
| Контрольная сыворотка                                                  | 1 флакон - 1 мл   | 1 флакон - 1 мл      |
| Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза                                        | 1 флакон - 8 мл   | 1 флакон - 16 мл     |
| Аналитический водно-солевой раствор                                    | 1 флакон - 6 мл   | 1 флакон - 12мл      |
| Водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови | 1 флакон - 50 мл  | 2 флакона – по 50 мл |
| Концентрированный буферный раствор для промывки лунок                  | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Раствор ТМБ                                                            | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона – по 14 мл |
| Стоп-реагент                                                           | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Прозрачный пластиковый пакет с замком                                  | 1 шт.             | 2 шт.                |

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**3.1.** Диагностическая специфичность набора определялась на 200 отрицательных сыворотках крови человека, и составила 99,5%.

**3.2.** Диагностическая чувствительность определялась на 100 положительных сыворотках крови человека, и составила 100%.

**3.3.** Коэффициент вариации результатов определения HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg» не превышает 8%.

**3.4.** Линейность. Зависимость концентрации HBsAg в анализируемых образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №3 - №6 и составляет 90-110%.

**3.5.** Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» HBsAg – проверка соответствия значения определяемой концентрации HBsAg расчётной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КП№3. Процент открытия составляет 90–110%.

**3.6.** Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация HBsAg по ОСО42-28-311-00 в анализируемом образце не превышает 0,05 МЕ/мл.

#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.

4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;

- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;

- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;

- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;

- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-1000 мл;

- стакан стеклянный подходящего объема;

- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;

- перчатки резиновые или пластиковые;

- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;

- контейнер для дезинфекции;

- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.



## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

**6.1.** Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

**6.2.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

**6.3.** Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка реагентов

**7.1.1.** Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

**7.1.2.** Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

**7.1.3.** Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,66 мл.

**7.1.4.** Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

**7.1.5.** Буфер А готов к использованию. Расход Буфера А на один стрип составляет 0,5 мл.

**7.1.6.** Буфер Д готов к использованию.

**7.1.7.** Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

**7.1.8.** Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.

**7.1.9.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В Приложениях 1 и 2 приведены схемы проведения количественного и качественного анализов, соответственно.

**7.1.10.** Разведение исследуемых образцов крови. Если концентрация HBsAg в исследуемых образцах по предварительным данным выше 5 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 1000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл буфера Д + 30 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

## **7.2. Постановка анализа**

**7.2.1.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

**7.2.1.1.** Количественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

**7.2.1.2.** Качественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1 (отрицательный контроль);

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2 (слабоположительный контроль);

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №6 (положительный контроль).

**7.2.2.** Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 25 мкл аналитического буфера.

**7.2.3.** Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

**7.2.4.** Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.



**7.2.5.** Не удаляя содержимого лунок, во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза.

**7.2.6.** Инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.7.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

**7.2.8.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

**7.2.9.** Инкубировать стрипы в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.10.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

**7.2.11.** Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 20 минут при температуре  $+18...25^{\circ}\text{C}$ .

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

*Примечание:* среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед.ОП.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 9.1. Количественный анализ

**9.1.1.** Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации HBsAg в калибровочных пробах (МЕ/мл) (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

*Примечание 1:* для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать программное обеспечение «ИФА Мастер».

*Примечание 2:* для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$



где  $B$  – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

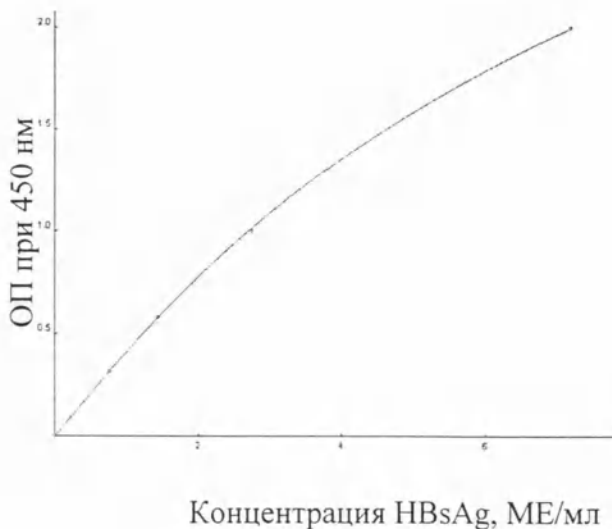
$B_T$  – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок  $A1$  и  $A2$ .

Определить содержание HBsAg в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию HBsAg умножить на фактор разведения.

**9.1.2.** Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации HBsAg, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6». Для точного определения концентрации необходимо выполнить разведение образцов в соответствии с п. 7.1.10.

**9.1.3.** Образцы с концентрацией ниже 0,05 МЕ/мл признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с концентрацией выше или равной 0,05 МЕ/мл должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.



**Рисунок 2. Типичный калибровочный график**

*Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!*

## 9.2. Качественный анализ

Для вычисления ОП<sub>крит.</sub> оптическую плотность КП №2 разделить на 2.

Образцы с оптической плотностью (ОП) ниже ОП<sub>крит.</sub> признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с ОП равной или выше ОП<sub>крит.</sub> должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.

## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**10.1.** Набор «ГепатитИФА-HBsAg» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

**10.2.** Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

**10.3.** В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- буфер Д, конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

**10.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4°эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого количественного анализа необходимо построение калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации HBsAg в контрольной сыворотке;
- для каждого независимого качественного анализа необходимо определение ОП КП№1, КП№2, КП№6 и расчёт ОП крит.;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

**10.5.** Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

**10.6.** Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.

10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-НВsAg» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор  
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем  
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:  
Директор ФГУН НИИЭМ  
имени Пастера Роспотребнадзора,  
член-корр. РАН, профессор



Жебрун А.Б.



СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ)

Приложение 1

| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                                | Температура          | Время                                               | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                        | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15' | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП и КС                                                         |                      |                                                     |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                            |                      |                                                     |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                       | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок,<br>50 мкл конъюгата анти-НВsAg-пероксидаза |                      |                                                     | Конъюгат анти-НВsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                       | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                         |                      |                                                     | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+ 266 мл Н <sub>2</sub> О           |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                             |                      |                                                     |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                       | +37°C                | 10'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реактента                                                  |                      |                                                     |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                         | КТ                   | 1 – 2'                                              | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                       |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции    | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                         |                      |                                                     | Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО                       |

| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                             | Температура          | Время                                            | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                     | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'  | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП 1; КП2; КП6                                               |                      |                                                  |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                         |                      |                                                  |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок, 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза |                      |                                                  | Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                      |                      |                                                  | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H <sub>2</sub> O          |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                          |                      |                                                  |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                    | +37°C                | 10'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реагента                                                |                      |                                                  |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                      | КТ                   | 1 – 2'                                           | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                    |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                      |                      |                                                  | Калькулятор                                                               |

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора

от «\_\_»\_\_20\_\_ г. №\_\_



Генеральный директор  
ООО «Компания Алкор Био» Швырев М.В.  
«22» ноября 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ  
НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**ПОВЕРХНОСТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА ГЕПАТИТА В**  
В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА  
(«ГепатитИФА-HBsAg»)

## 1. НАЗНАЧЕНИЕ

**1.1.** Набор реагентов «ГепатитИФА-HBsAg» предназначен для качественного и количественного определения поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В (HBV) в сыворотке и плазме крови человека.

**1.2.** Поверхностный антиген (HBsAg) представляет собой гликозилированный белок оболочки HBV и является важным маркером инфицирования. HBsAg содержит детерминанту «а», общую для всех субтипов вируса и дополнительные субдетерминанты (d и у), определяющие иммунологические различия подгрупп (ad и au). В настоящее время это основной маркер при определении инфицирования вирусом гепатита В. HBV вызывает острый и хронический вирусный гепатит и чаще других вирусных гепатитов передается при переливании крови. Он вызывает целый спектр проявлений, варьирующих от мягкой, бессимптомной формы до молниеносного гепатита, серьезных поражений печени и цирроза. Кроме того, ясно доказана роль HBV в развитии первичного рака печени.

Количественное определение HBsAg в крови представляется целесообразным при корректировке диагноза и подборе лечения. При проведении скрининга на гепатит В достаточно качественного определения HBsAg в крови.

**1.3.** Набор выпускается в двух вариантах комплектации:

Комплектация на 96 определений рассчитана на количественный анализ в дубликатах 40 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 44 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

Комплектация на 192 определения рассчитана на количественный анализ в дубликатах 80 неизвестных, либо качественный анализ в дубликатах 88 неизвестных проб, при использовании всех стрипов одновременно.

**Обратите внимание, что при количественном анализе определение оптических плотностей калибровочных проб и раствора ТМБ, а также определение концентрации контрольной сыворотки обязательно на каждом планшете.**



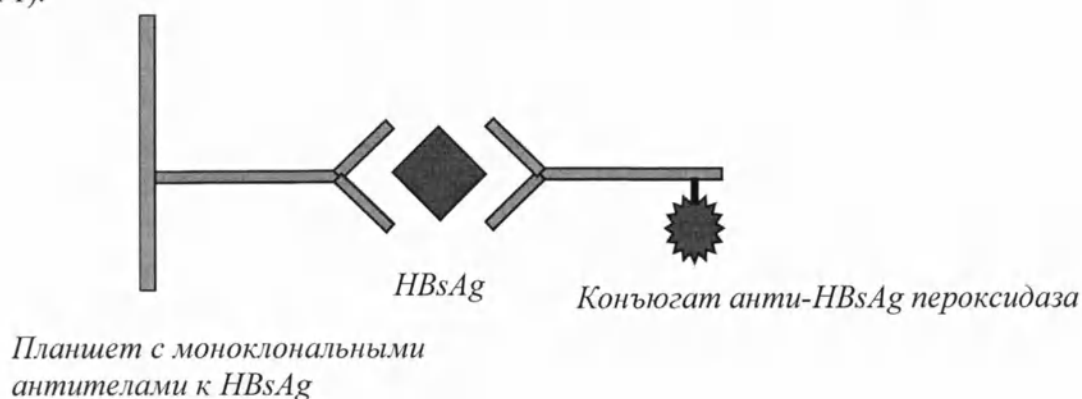
Обратите внимание, что при качественном анализе определение оптических плотностей калибровочной пробы №1 (отрицательный контроль), калибровочной пробы №2 (слабоположительный контроль), калибровочной пробы №6 (положительный контроль) и раствора ТМБ, обязательно на каждом планшете.

*Примечание: в случае дробного применения набор может быть использован только в течение месяца после вскрытия компонентов набора.*

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

### 2.1. Принцип действия

В наборе «ГепатитИФА-HBsAg» реализован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для этого использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к HBsAg. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация HBsAg, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации HBsAg. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству HBsAg в исследуемом образце (Рисунок 1).



**Рисунок 1. Схема анализа**

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации HBsAg в анализируемых пробах. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация HBsAg в исследуемых образцах. Наличие HBsAg в случае проведения качественного анализа оценивается относительно значения, полученного делением оптической плотности КП №2 на 2 (ОП крит.).

### 2.2. Состав набора

- комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к HBsAg маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к HBsAg» – 1 упаковка или 2 упаковки, в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• калибровочные пробы (КП), аттестованные по международному стандарту на HBsAg NIBSC 00/588, содержащие известные количества HBsAg. Флаконы маркированы «Калибровочная проба №1», «Калибровочная проба №2», «Калибровочная проба №3», «Калибровочная проба №4», «Калибровочная проба №5», «Калибровочная проба №6»; точные значения концентрации HBsAg указаны на этикетках флаконов, ориентировочные: 0; 0.1; 0.5; 1.0; 2.0; 5.0 МЕ/мл; 6 флаконов (по 1 мл) (лиофилизированные препараты или жидкости) (см. таблицу 1);

• конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» - 1 флакон (8 мл) или 1 флакон (16 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• аналитический водно-солевой раствор, маркирован «Буфер А» - 1 флакон (6 мл) или 1 флакон (12 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови, маркирован «Буфер Д» - 1 флакон (50 мл) или 2 флакона (50 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок, маркирован «Буфер Р» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» - 1 флакон (14 мл) или 2 флакона (14 мл) в зависимости от варианта комплектации (см. таблицу 1);

• контрольная сыворотка с известным содержанием HBsAg, маркирована «Контрольная сыворотка» - 1 флакон (1 мл) (лиофилизированный препарат или жидкость) (см. таблицу 1);

• прозрачный пластиковый пакет с замком (при упаковке стрипов в пакет из 2-слойного полиэтилена) – 1 шт. или 2 шт. в зависимости от комплектации (см. таблицу 1).

Таблица 1. Варианты комплектации

| Название компонента                                                    | 96 определений    | 192 определения      |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Комплект стрипов                                                       | 1 комплект        | 2 комплекта          |
| Комплект калибровочных проб                                            | 1 комплект - 1 мл | 1 комплект - 1 мл    |
| Контрольная сыворотка                                                  | 1 флакон - 1 мл   | 1 флакон - 1 мл      |
| Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза                                        | 1 флакон - 8 мл   | 1 флакон - 16 мл     |
| Аналитический водно-солевой раствор                                    | 1 флакон - 6 мл   | 1 флакон - 12мл      |
| Водно-солевой раствор для разведения образцов сыворотки и плазмы крови | 1 флакон - 50 мл  | 2 флакона – по 50 мл |
| Концентрированный буферный раствор для промывки лунок                  | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Раствор ТМБ                                                            | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона – по 14 мл |
| Стоп-реагент                                                           | 1 флакон - 14 мл  | 2 флакона - по 14 мл |
| Прозрачный пластиковый пакет с замком                                  | 1 шт.             | 2 шт.                |

### 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Диагностическая специфичность набора определялась на 200 отрицательных сыворотках крови человека, и составила 99,5%.

3.2. Диагностическая чувствительность определялась на 100 положительных сыворотках крови человека, и составила 100%.

3.3. Коэффициент вариации результатов определения HBsAg в одном и том же образце с использованием набора «ГепатитИФА-HBsAg» не превышает 8%.

3.4. Линейность. Зависимость концентрации HBsAg в анализируемых образцах сыворотки крови при разведении их буфером Д имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб №3 - №6 и составляет 90-110%.

3.5. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» HBsAg – проверка соответствия значения определяемой концентрации HBsAg расчётной величине, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и КПП №3. Процент открытия составляет 90–110%.

3.6. Аналитическая чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация HBsAg по ОСО42-28-311-00 в анализируемом образце не превышает 0,05 МЕ/мл.



#### 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 3.
- 4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».
- 4.4. Стоп-реагент представляет собой 1 Н раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.
- 4.5. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. производные крови, входящие в состав набора, и исследуемые образцы являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать возбудителей различных вирусных инфекций.
- 4.6. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.7. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

#### 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 400–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; 40–200 мкл; 200–1000 мкл; 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 50-1000 мл;
- стакан стеклянный подходящего объема;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- 1% раствор гипохлорита натрия или 6% раствор перекиси водорода;
- контейнер для дезинфекции;
- ванночки для внесения реагентов восьмиканальной пипеткой.

## 6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

**6.1.** Забор крови из вены осуществляют с соблюдением правил асептики. После формирования сгустка сыворотку отделяют путем центрифугирования. Забор крови для получения плазмы осуществляют в пробирку, содержащую антикоагулянт. После центрифугирования сыворотку или плазму переносят в отдельную пробирку.

**6.2.** Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или мутную сыворотку и плазму, а также образцы сыворотки, содержащие азид натрия.

**6.3.** Образцы сыворотки и плазмы крови разрешается хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 2 суток; при необходимости более длительного хранения рекомендуется аликвотировать образец и хранить в замороженном виде при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Не допускается повторное замораживание образца.

## 7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

### 7.1. Подготовка реагентов

**7.1.1.** Стрипы. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не менее 30 минут. Вскрыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов.

**7.1.2.** Жидкие калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

Для восстановления лиофилизированных калибровочных проб и контрольной сыворотки перед вскрытием флаконов легким постукиванием стряхнуть частицы, прилипшие к стенкам флаконов или к крышкам. Открыть флаконы и положить крышки перевернутыми на сухую поверхность. В каждый флакон с калибровочной пробой и контрольной сывороткой внести по 1 мл дистиллированной воды и закрыть крышками. Выдержать флаконы в течение 10 минут при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) без перемешивания. Затем, аккуратно наклоняя и вращая флаконы, перемешать их содержимое до полного растворения, избегая пенообразования. В течение следующих 10 минут выдержать флаконы при комнатной температуре, периодически перемешивая.

**7.1.3.** Конъюгат Е готов к использованию. Расход конъюгата на один стрип составляет 0,66 мл.

**7.1.4.** Промывочный раствор. Необходимое количество буфера Р развести дистиллированной водой в 20 раз. Например:

5 мл буфера Р + 95 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования.

**7.1.5.** Буфер А готов к использованию. Расход Буфера А на один стрип составляет 0,5 мл.

**7.1.6.** Буфер Д готов к использованию.

**7.1.7.** Раствор тетраметилбензидина (ТМБ) готов к использованию. Расход ТМБ на один стрип составляет 1,15 мл.

**7.1.8.** Стоп-реагент готов к использованию. Расход стоп-реагента на один стрип составляет 1,15 мл.



**7.1.9.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

В Приложениях 1 и 2 приведены схемы проведения количественного и качественного анализов, соответственно.

**7.1.10.** Разведение исследуемых образцов крови. Если концентрация HBsAg в исследуемых образцах по предварительным данным выше 5 МЕ/мл, образцы следует развести буфером Д в 100 и 1000 раз. Пример подготовки образца к анализу:

Образец № 1 (разведение в 100 раз):

990 мкл буфера Д + 10 мкл исследуемого образца.

Образец № 2 (разведение в 1000 раз):

270 мкл буфера Д + 30 мкл образца № 1.

При каждом разведении необходимо тщательное перемешивание.

## **7.2. Постановка анализа**

**7.2.1.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

**7.2.1.1.** Количественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1;

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2;

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №3;

E1, E2 – № 5 - для измерения величины оптической плотности КП №4;

F1, F2 – № 6 - для измерения величины оптической плотности КП №5;

G1, G2 – № 7 - для измерения величины оптической плотности КП №6;

H1, H2 – № 8 - для измерения величины оптической плотности контрольной сыворотки.

**7.2.1.2.** Качественный анализ:

A1, A2 – № 1 - для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;

B1, B2 – № 2 - для измерения величины оптической плотности КП №1 (отрицательный контроль);

C1, C2 – № 3 - для измерения величины оптической плотности КП №2 (слабоположительный контроль);

D1, D2 – № 4 - для измерения величины оптической плотности КП №6 (положительный контроль).

**7.2.2.** Внести во все лунки, кроме лунок A1 и A2, по 25 мкл аналитического буфера.

**7.2.3.** Внести в соответствующие лунки по 100 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 100 мкл исследуемых образцов в дубликатах.

***Примечание:** общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых сывороток крови не должно превышать 15 минут, иначе время инкубации разных образцов будет значительно различаться, что приведет к неправильным результатам.*

**7.2.4.** Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.



**7.2.5.** Не удаляя содержимого лунок, во все лунки, кроме A1 и A2, немедленно внести по 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза.

**7.2.6.** Инкубировать в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.7.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором (1% раствором гипохлорита натрия или 6% раствором перекиси водорода) и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного раствора, приготовленного по п. 7.1.4., встряхнуть рамку на шейкере в течение 5-10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

Допускается промывка лунок при помощи автоматического промывочного устройства.

**7.2.8.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора тетраметилбензидина.

**7.2.9.** Инкубировать стрипы в течение 10 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 600–800 об/мин.

**7.2.10.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1-2 минут.

**7.2.11.** Если невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 7.2.10., то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение не более 20 минут при температуре +18...25°C.

## 8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность в лунках при длине волны 450 нм.

При регистрации результатов **необходимо вычитать** величину оптической плотности в лунках A1 и A2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок.

*Примечание:* среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках A1 и A2 не должно превышать 0,09 ед. ОП.

## 9. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 9.1. Количественный анализ

**9.1.1.** Построить калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации HBsAg в калибровочных пробах (МЕ/мл) (Рисунок 2). Внешний вид графика зависит от способа преобразования осей.

*Примечание 1:* для построения калибровочных графиков рекомендуется использовать программное обеспечение «ИФА Мастер».

*Примечание 2:* для построения калибровочного графика на масштабной бумаге необходимо использовать данные оптических плотностей после вычитания из них средней величины оптической плотности лунок с ТМБ.

Если программа фотометра не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок A1 и A2, то необходимо пользоваться формулой:

$$B - B_T,$$

где  $B$  – среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы,

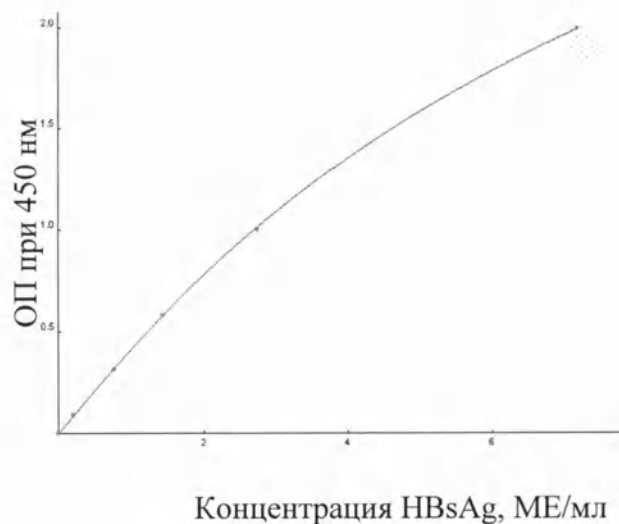
$B_T$  – среднее арифметическое значение оптической плотности лунок  $A1$  и  $A2$ .

Определить содержание HBsAg в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию HBsAg умножить на фактор разведения.

**9.1.2.** Экстраполяция калибровочного графика для значений концентрации HBsAg, превышающих номинал КП №6, не допускается. При наличии таких случаев принимать значение концентрации исследуемого образца «выше концентрации КП №6». Для точного определения концентрации необходимо выполнить разведение образцов в соответствии с п. 7.1.10.

**9.1.3.** Образцы с концентрацией ниже 0,05 МЕ/мл признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с концентрацией выше или равной 0,05 МЕ/мл должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.



**Рисунок 2. Типичный калибровочный график**

*Запрещается использовать для оценки реальных экспериментальных данных!*

## 9.2. Качественный анализ

Для вычисления ОП<sub>крит.</sub> оптическую плотность КП №2 разделить на 2.

Образцы с оптической плотностью (ОП) ниже ОП<sub>крит.</sub> признают отрицательными (не содержащими HBsAg).

Образцы с ОП равной или выше ОП<sub>крит.</sub> должны быть проанализированы в тест-системе «ГепатитИФА-HBsAg-подтверждающий» для элиминации ложноположительных результатов.



## 10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

**10.1.** Набор «ГепатитИФА-HBsAg» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до  $+25^{\circ}\text{C}$  не более 5 суток.

Срок годности набора – 12 месяцев.

**10.2.** Набор следует вынимать из холодильника не более чем за 1 час до начала анализа, но не позже, чем за 30 минут до проведения анализа.

**10.3.** В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы поместить сначала в пакет с этикеткой, затем в пластиковый пакет с замком и герметично закрыть. Хранить в герметично закрытом пакете при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности;
- жидкие, готовые к использованию, калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- восстановленные (растворенные) из лиофилизированных препаратов калибровочные пробы и контрольную сыворотку хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- буфер Д, конъюгат Е, буфер А и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  не более 1 месяца;
- промывочный раствор, подготовленный к использованию, хранить закрытым при комнатной температуре ( $+18...25^{\circ}\text{C}$ ) не более 5 суток;
- буфер Р и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре  $+2...8^{\circ}\text{C}$  в течение всего срока годности.

**10.4.** При использовании набора для проведения нескольких независимых анализов необходимо иметь в виду следующее:

- количество независимых экспериментов, которое можно провести с помощью данного набора (4°эксперимента), ограничено объемом калибровочных проб;
- для каждого независимого количественного анализа необходимо построение калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации HBsAg в контрольной сыворотке;
- для каждого независимого качественного анализа необходимо определение ОП КПН<sub>1</sub>, КПН<sub>2</sub>, КПН<sub>6</sub> и расчёт ОП крит.;
- запрещается возвращать избыток конъюгата, буфера А, ТМБ и стоп-реагента из ванночек во флаконы;
- из флаконов с открытыми крышками происходит испарение, которое может привести к получению некорректных результатов при повторном использовании реагентов. После окончания внесения реагентов в лунки планшета на каждой стадии анализа необходимо плотно закрывать крышки флаконов и помещать в рекомендуемые условия хранения.

**10.5.** Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных партий, за исключением ТМБ, стоп-реагента и концентрированного промывочного раствора, входящего в состав данного набора реагентов.

**10.6.** Запрещается использовать концентрированный промывочный раствор, стоп-реагенты и ТМБ из наборов реагентов других фирм-производителей.



10.7. К работе с набором допускается только специально обученный персонал.

10.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

По вопросам качества набора «ГепатитИФА-HBsAg» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70, телефон/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор  
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель лаборатории разработки ИФА-систем  
ООО «Компания АлкорБио»

Сусорова А.С.

СОГЛАСОВАНО:  
Заместитель директора  
ФГУ «ФЦСКЭ им.В.А.Алмазова»  
Минздравсоцразвития России  
по научно-исследовательской работе,  
профессор



Конради А.О.

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА (КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ)

Приложение 1

| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                             | Температура          | Время                                               | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                     | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП, КС и исследуемых образцов не более 15' | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП и КС                                                      |                      |                                                     |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                         |                      |                                                     |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок, 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза |                      |                                                     | Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                      |                      |                                                     | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р+ 266 мл H <sub>2</sub> O           |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                          |                      |                                                     |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                    | +37°C                | 10'                                                 | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реагента                                                |                      |                                                     |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                      | КТ                   | 1 – 2'                                              | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                    |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции    | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                      |                      |                                                     | Калькулятор и масштабная бумага/ соответствующее ПО                       |

12

Примечания:

КП – калибровочная проба; КС – контрольная сыворотка; ОП – оптическая плотность;

КТ – комнатная температура (+18...25°C); ПО – программное обеспечение

106

| №  | Стадия (операция)            | Реагенты                                                             | Температура          | Время                                            | Примечания                                                                |
|----|------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Внесение реагентов           | 25 мкл буфера А в лунки для исследуемых образцов                     | КТ<br>+18<br>...25°C | Внесение КП и исследуемых образцов не более 15'  | В лунки для определения ОП ТМБ ничего не вносить                          |
| 2  |                              | 100 мкл КП 1; КП2; КП6                                               |                      |                                                  |                                                                           |
| 3  |                              | 100 мкл исследуемых образцов                                         |                      |                                                  |                                                                           |
| 4  | Инкубация №1                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 5  | Внесение конъюгата           | Не удаляя содержимого лунок, 50 мкл конъюгата анти-HBsAg-пероксидаза |                      |                                                  | Конъюгат анти-HBsAg-пероксидаза не вносить в лунки для определения ОП ТМБ |
| 6  | Инкубация №2                 | —                                                                    | +37°C                | 30'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 7  | Промывка                     | 300 мкл в лунку 1*промывочного раствора (5 раз)                      |                      |                                                  | 1*промывочный раствор = 14 мл буфера Р + 266 мл H <sub>2</sub> O          |
| 8  | Внесение хромогена           | 100 мкл ТМБ                                                          |                      |                                                  |                                                                           |
| 9  | Инкубация с ТМБ              | —                                                                    | +37°C                | 10'                                              | Термостатируемый шейкер, 600 – 800 об/мин                                 |
| 10 | Остановка ферментной реакции | 100 мкл стоп-реактанта                                               |                      |                                                  |                                                                           |
| 11 | Перемешивание                |                                                                      | КТ                   | 1 – 2'                                           | шейкер                                                                    |
| 12 | Регистрация результатов      | —                                                                    |                      | В течение 20' после остановки ферментной реакции | 450 нм                                                                    |
| 13 | Обработка результатов        |                                                                      |                      |                                                  | Калькулятор                                                               |



Прошито, пронумеровано, скреплено  
печатью 13 (примечать) листов

Генеральный директор  
ООО «Компания Алкор Био»  
М.В. Швырев

