

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНА Е ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBeAg)

## 1705-12, HBeAg ELISA

Каталог. № : 1705-12

Методика от 08-27-2013

Количество : 96

Производитель: DAI (США)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	HBeAg ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Сэндвич ИФА: Двойные антитела
Диапазон обнаружения	Качественный Положительный; Отрицательный
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	~ 99 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	18 месяцев от даты производства

*\*Лабораторные анализы не могут быть единственными критериями для медицинского заключения. История болезни пациента и последующие тесты должны быть приняты во внимание.*

### НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения HBeAg в человеческой сыворотке или плазме. Предназначен для диагностики и мониторинга пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

### ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Полистирольные микроячейки предварительно покрыты моноклональными антителами, специфичными к HBeAg. Образцы сыворотки или плазмы добавляются в микроячейки вместе со вторым антителом, конъюгированным пероксидазой хрена (HRP) и направлены против эпитопа HBeAg. Во время инкубации специфический иммунокомплекс при присутствии в образце HBeAg, привязывается к твердой фазе. После промывания для удаления протеиново образцов сыворотки и несвязанный HRP-конъюгат, добавляется в ячейки раствор хромогена, содержащий TMB и перекись мочевины. При присутствии антитело-антиген-антитело(HRP) «сэндвич» иммунокомплекса, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP-конъюгата в голубой окрас. Голубой окрас изменяется на желтый после остановки реакции с серной кислотой. Количество цвета можно измерить и он пропорционален количеству антигена в образце. Ячейки, содержащие образцы, отрицательные к HBeAg, остаются бесцветными.

**Принцип ИФА типа "сэндвич" двойного антитела**  
(См. в оригинале инструкции на англ. языке.)

### КОМПОНЕНТЫ

- **Микролуночный планшет;** зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем. **12 8-ячейковых** стрипов на планшет. Каждая ячейка содержит моноклональные антитела, реактивные к HBeAg. Микроячейковые стрипы могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные ячейки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтоватая жидкость во флаконе с зеленой крышкой. 1 мл во флаконе. Протеин-стабилизирующий буфер, тестируемый на не-реактивность к HBeAg. Консерванты: 0,1% Проклин 300. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Положительный контроль, 1 фл.**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой, 1 мл во флаконе. HBeAg, разбавленный в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1% Проклин 300. Готов к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.

- **HRP-конъюгат реагент, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой. 6,5 мл во флаконе. Анти-HBeAg антитела, конъюгированные пероксидазой хрена. Готов к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Исходный моющий буфер, 1 бут.**  
**Разбавить перед использованием**  
Бесцветная жидкость в бутылке с белой крышкой. 30 мл в бутылке. PH 7.4, 20X PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)  

<b>Концентрат</b>	<b>необходимо</b>	<b>разбавить</b>	<b>1:20</b>
дистиллированной/деионизированной		водой	перед
использованием.			использованием.

 После разбавления стабильны одну неделю при комнатной температуре или две недели при 2-8°C.
- **Раствор хромогена А, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой, 7 мл во флаконе. Раствор перекиси мочевины. Готов к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой, 7 мл во флаконе. TMB раствор, TMB, растворенный в лимонной кислоте. Готов к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с белой крышкой, 7 мл во флаконе. Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **Пластиковый пакет, 1 шт.**  
Для неиспользуемых стрипов
- **Картонные дощечки для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- **Инструкция, 1 копия**

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ, ЧТО НЕ ПОСТАВЛЯЮТСЯ

1. Свежая дистиллированная или деионизированная вода
2. Одноразовые перчатки и часы
3. Контейнер для отходов.
4. Сменный лоток V-формы.
5. Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
6. Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
7. Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5°C.
8. Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный ридер, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
10. Микропланшетная система для аспирации/промывания.

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранной венопункцией, должна стечь естественным путем. Необходимо проследить, что образцы сыворотки не содержали микроорганизмов. Любые видимые частицы в образце необходимо удалить центрифугированием при 3000 RPM 20 минут при комнатной температуре или фильтрацией на 0,22 и фильтре. Плазма, собранная в EDTA, цитрат натрия или гепарин может тестироваться, но нельзя использовать высоко липемические, иктерические или гемолизированные образцы, что могут дать фальшивые результаты. Не нагревайте инактивированные образцы. Это может вызвать ухудшение образцов.
2. **Транспортирование и хранение:** Храните образцы при 2-8°C. Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до -20°C или ниже. Избегайте многократных замораживания/оттаивания.

### СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ДЛЯ ПРОМЫВАНИЯ

1. Правильная процедура промывания важна для корректных и точных данных.
2. Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный вошер хорошего качества. В основном требуется не менее 5 моющих циклов при 350-400 мкл на ячейку для предотвращения фальшиво положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое ячеек, а дайте возможность планшетному вошеру автоматически аспирировать его.
4. Мы рекомендуем калибровать вошер. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносится достаточное количество объема, моющего буфера.
5. При ручном промывании необходимо 5 циклов промывания при 350-400 мкл на ячейку и аспирировать жидкость 5 раз. Если

получены низкие результаты, увеличьте количество циклов промывания и время выдержки.

- При аспирации жидкости из ячеек, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
- Концентрированный моющий буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного планшета смешайте 30 мл концентрата с 570 мл воды. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем моющего буфера.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока пригодности, указанной на этикетке при хранении при 2-8°C, **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Только для диагностики **IN VITRO**.

#### ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

ELISA анализ является чувствительным к температуре и времени. Для точных результатов строго следуйте инструкции.

- Не меняйте реагенты разных лотов и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
- Убедитесь, что все реагенты соответствуют своему лоту. Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
- ВНИМАНИЕ - ВАЖНЫЙ ШАГ:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-25°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
- Используйте только достаточный объем образца, как указано в процедуре шагов. Если этого не сделать, может привести к низкой чувствительности анализа.
- Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности ячеек; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
- При считывании убедитесь, что ячейки сухие и нет пузырей.
- Не допускайте высыхания ячеек после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.
- Избегайте длительных перерывов между шагами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех ячеек.
- Калибруйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
- Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
- Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37°C.
- При добавлении образца не дотрагивайтесь ко дну ячеек.
- При измерении планшетным ридером, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
- Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированными. Строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
- Материалы человеческого происхождения могут быть использованы в наборе. Эти материалы были протестированы и оказались отрицательными на наличие антител к ВИЧ 1/2, ВГС ТП и HBsAg. Тем не менее, нет аналитического метода, который может гарантировать, что инфекционные агенты образцов и реагентов полностью отсутствуют. Поэтому обрабатывать реагенты и образцы с особой осторожностью, как если бы они являлись потенциальным источником инфекционных заболеваний. Никогда не ешьте, не пейте, не курите, не пользуйтесь косметикой в лаборатории.
- Бычья сыворотка, возможно, использовались в этом наборе. Бычий сывороточный альбумин (BSA) и фетальная телячья сыворотка (FCS) были получены от животных в географических районах, свободных от BSE/TSE.
- Наконечники пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при 121°C или обработать 10% гипохлоридом натрия в течение 30 минут.
- Стоп раствор является сильной кислотой. **ЯДОВИТЫЙ**. Используйте осторожно. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте водой. ProClip 300, что используется в качестве консерванта, может вызывать раздражение кожи.
- На ферментную активность HRP-конъюгата могут влиять пыль и реактивные химикалии и вещества, такие как гипохлорид натрия, кислоты, щелочи и т.п. Не проводите анализ при присутствии этих веществ.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) на протяжении минимум 15-30 минут. Проверьте концентрат моющего буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный моющий буфер 1:20 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления моющего буфера.
- Число ячеек:** Поместите необходимые стрипы в держатель и пронумеруйте необходимое количество лунок, в том числе три Отрицательных контроля (**например, B1, C1, D1**), два Положительных контроля (**например, E1, F1**) и одного бланка (**например, A1**, ни образцы, ни HRP-конъюгат не должны быть добавлены в пустую лунку). Если результаты будут определяться с помощью двойной длины волны, потребность в использовании бланка может отсутствовать. Используйте только число полосок, необходимых для анализа.
- Добавление образца и HRP-конъюгата:** Добавьте 50 мкл положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие ячейки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Добавьте 50 мкл HRP-конъюгата в каждую ячейку кроме бланка и смешайте легким постукиванием по планшету.
- Инкубация:** Накройте планшет и инкубируйте 60 минут при 37°C. Рекомендуется использовать водяной резервуар для поддержания стабильной температуры и влажности во время инкубации. Если используется сухой инкубатор, не открывайте двери часто.
- Промывание:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую ячейку 5 раз моющим буфером. Каждый раз выдержите ячейки 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
- Образование окраса:** Внесите 50 мкл хромогена А и 50 мкл хромогена В в каждую ячейку, включая **бланк** и смешайте постукиванием по планшету. Инкубируйте планшет 15 минут при 37°C, в темном месте. Энзимная реакция между хромогеном и HRP-конъюгатом вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и HBeAg положительном образце.
- Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите 50 мкл стоп раствора в каждую ячейку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и HBeAg положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
- Измерение абсорбции:** Калибруйте планшетный ридер ячейкой бланка и считайте абсорбцию при 450 нм. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите длину волны при 630 нм. Вычислите величину исключения и оцените результаты (**Примечание: считайте абсорбцию в течение 5 минут после остановки реакции**).

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каждый планшет должен приниматься отдельно, несмотря на количество анализируемых планшетов. Результаты вычисляются как отношение ОП образца к величине исключения (CO). Если величина исключения была считана на планшетном ридере с одним фильтром, результаты необходимо вычислять отниманием ОП ячейки бланка от напечатанных величин образцов и контролей. Если считывается на планшетном ридере с двойным фильтром, не отнимайте ОП ячейки бланка от напечатанных образцов и контролей.

#### 1. Вычисление граничного значения (CO) = \*Nc x 2.1

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

**Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже 0.05, принимайте ее как 0.05.**

#### Пример:

##### 1. Расчет Nc:

Номер лунки	B1	C1	D1
Значения ОП Отрицательных контролей	0.02	0.012	0.016

$N_c = 0.016$  ( $N_c$  ниже, чем 0.05; принять как 0.05)

##### 2. Расчет Порогового значения: (CO) = 0.05 x 2.1 = 0.105

Если один из отрицательных контролей не соответствует спецификации диапазона контроля качества, его необходимо отбросить и вычислить среднее двух оставшихся величин. Если ОП более чем одного контроля не соответствует спецификации диапазона контроля качества, тест неверный и его нужно повторить.

## 2. Диапазон контроля качества:

Тестовые результаты достоверны, если выполнены критерии контроля качества. Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

- Абсорбция бланка ниже 0.080 при 450 нм.
- Абсорбция ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0.800.
- Абсорбция ОП отрицательного контроля должна быть равна или ниже 0.100 после бланкирования.

## 3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция (OD) каждого образца)

**Отрицательные результаты (S/CO<1):** образцы, что дали абсорбцию ниже величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие поверхностного антигена к гепатиту В. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HBV.

**Положительные результаты (S/CO≥1):** образцы дали абсорбцию выше или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие поверхностного антигена к гепатиту В. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные к HBeAg и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В.

**Граничные (S/CO= 0.9-1.1):** Образцы с коэффициентом абсорбции к величине исключения между 0,9 и 1,00 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на HBeAg.

## ТЕСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

**Клиническая Специфичность:** клиническая специфичность была определена на панели образцов, полученных от 4360 здоровых доноров крови и 150 не диагностированных госпитализированных пациентов. Повторно реактивные образцы и образцы при подтверждении положительности установленным тестом не включены в вычисление специфичности.

**Клиническая Чувствительность** этого набора была вычислена на панели образцов, полученных от 813 пациентов с гепатитом В с четко характеризированной клинической историей, что основывается на анализах для определения HBeAg, HbeAg, анти-HBs, анти-Hbe и анти-Hbсю Лицензированный HBeAg тест использовался как подтверждение анализа. Оценка результатов дана ниже. Результаты, полученные в индивидуальной лаборатории, могут отличаться.

### Аналитическая специфичность

Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HIV, HCV, CMV и TP.

Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.

Не наблюдались побочных эффектов до концентрации к HBeAg 150000 NCU при клинических тестированиях. Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Специфичность	Образцы	-	+
Доноры крови	4360	4346	14
Пациенты	150	132	18
Всего	4510	4478	32
	<b>Подтвержденные положительные</b>	<b>Специфичность</b>	<b>Ложно положительные</b>
Доноры крови	9	99.86 %	5
Пациенты	18	100 %	0
Всего	27	99.93 %	5

Чувствительность	Образцы	-	+
Острый	378	172	206
Хронический	347	162	185
Восстановление	88	63	25
Всего	813	397	416
	<b>Подтвержденные положительные</b>	<b>Чувствительность</b>	<b>Ложно отрицательные</b>
Острый	206	100 %	0
Хронический	185	100 %	0
Восстановление	25	100 %	0
Всего	416	100 %	0

Воспроизводимость		Внутри тестовая	
Тип образца	№	Средняя ОП	КВ %
Слабо положительный	10	0.450	9.0
Умеренно положительный	10	1.53	8.1
Сильно положительный	10	2.3	6.3

Положительный контроль	10	2.4	5.5
------------------------	----	-----	-----

Воспроизводимость		Между тестовая	
Тип образца	№	Средняя ОП	КВ %
Слабо положительный	10	0.421	9.7
Умеренно положительный	10	1.47	8.5
Сильно положительный	10	2.3	6.7
Положительный контроль	10	2.4	5.7

## ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Не повторяющиеся положительные результаты могут появляться из-за основных биологических характеристик ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности. Однако в редких случаях некоторые HBV мутанты или подтипы могут оставаться неопределяемыми. Антигены могут быть неопределяемые во время ранней стадии заболевания и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.
2. Положительные результаты должны подтверждаться другим доступным методом. Любые положительные результаты должны интерпретироваться с историей пациента и другими клиническими и лабораторными данными.
3. Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
4. Преобладание маркера влияет на величины анализа.

## ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

1. Значения положительного или отрицательного контроля, которые находятся вне указанного диапазона контроля качества, являются индикатором возможного ухудшения реагентов и/или оператора или оборудования ошибок. В таком случае результаты должны быть признаны недействительными и образцы должны быть протестированы повторно. В случае постоянных ошибочных результатов классифицированы как из-за износа или нестабильности реагентов немедленно замените реагенты новыми.
2. Если после смешивания хромогена А и растворов в лунках цвет меняется на синий в течение нескольких минут, не продолжайте проведение испытаний и замените реагенты новыми.

## СРОК ДЕЙСТВИЯ

**Пожалуйста, не используйте этот набор после истечения срока годности, указанного на упаковке набора реагентов.**

## СУММИРОВАНИЕ

Добавить образец	50 мкл
Добавить HRP-конъюгат	50 мкл
Инкубировать при 37°C	60 минут
Промыть	5 раз
Образование окраса	50 мкл А + 50 мкл В
Инкубировать при 37°C	15 мин.
Остановить реакцию	50 мкл стоп раствора
Считать абсорбцию	450 нм или 450/630 нм



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)