



## Набор для определения гепатита В вируса Е антиген (HBeAg)

### HBeAg ELISA KIT

**Кат. номер** : 137-1705-12  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DAI (USA)

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика 06-31-01

### НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения HBeAg в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для использования в клинических лабораториях для диагностики и исследования пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

### ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

В наборе используется метод «сэндвича», в котором полистироловые микроячейки предварительно покрыты моноклональными антителами, специфическими для HBeAg. Образцы сыворотки или плазмы добавляются в микроячейки вместе с вторым моноклональным антителом, конъюгированным пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) и направлены против эпитопа HBeAg. Во время инкубации специфический иммунокомплекс при присутствии в образце HBeAg, привязывается к твердой фазе. После промывания для удаления протеинов образцов сыворотки и несвязанный HRP-конъюгат, добавляется в ячейки раствор хромогена, содержащий тетраметилбензидин (ТМВ) и перекись мочевины. При присутствии антитело-антиген-антитело (HRP) «сэндвич» иммунокомплекса, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP-конъюгата в продукт голубого цвета. Голубой цвет изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Интенсивность цвета можно измерить и он пропорционален количеству антигена в образце. Ячейки, содержащие образцы отрицательные к HBeAg остаются бесцветными.

### Принцип сэндвича двойного антитела

См. в оригинале инструкции на англ. языке.

### КОМПОНЕНТЫ

96 тестов

▪ **Микроячейковый планшет – 1 планшет**  
 Пустые микроячейковые стрипы зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.

8x12/12x8-ячейковых стрипов на планшет.

Каждая ячейка содержит моноклональные антитела, реактивные к HBeAg (анти-HBs). Микроячейковые стрипы могут использоваться раздельно.

Поместите неиспользованные ячейки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.

- **Отрицательный контроль - 1 флакон**  
 Желтоватая жидкость в флаконе с зеленой крышкой 1 мл в флаконе.  
 Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к HBeAg.  
 Консерванты: 0,1% ProClin 300  
 Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Положительный контроль - 1 флакон**  
 Красная жидкость в флаконе с красной крышкой 1 мл в флаконе.  
 Рекомбинант, безвредный HBeAg, разбавленный в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % ProClin 300  
 Поставляется готовым к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **HRP-конъюгат реагент - 1 флакон**  
 Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой. 6,5 мл в флаконе.  
 Анти-HBeAg антитела, конъюгированные пероксидазой хрена.  
 Поставляется готовым к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Исходный моющий буфер - 1 бутылка**  
**Разбавить перед использованием**  
 Бесцветная жидкость в бутылке с белой крышкой. 30 мл в бутылке.  
 PH 7,4 20 x PBS (содержащий Tween-20 в качестве детергента).  
**Концентрат необходимо разбавить 1:20** дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабильны одну неделю при комнатной температуре или две недели при 2-8°C.
- **Раствор хромогена А - 1 флакон**  
 Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой.  
 7 мл в флаконе.  
 Раствор перекиси мочевины/  
 Поставляется готовым к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Раствор хромогена В - 1 флакон**  
 Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой  
 7 мл в флаконе.  
 ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте/  
 Поставляется готовым к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Стоп раствор - 1 флакон**  
 Бесцветная жидкость в белом флаконе с белой крышкой.  
 7 мл в флаконе.  
 Разбавленный раствор серной кислоты (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **Пластиковый склеивающийся пакет - 1 шт.**  
 Для неиспользуемых стрипов
- **Картонные дощечки для накрытия планшета - 1 лист**  
 Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения ячеек.

Сводка основных компонентов набора	
Микроячейковый планшет	Один/96 ячеек
Негативный/Негативный контроль	Каждый/1 мл
HRP-конъюгат	Один/6,5 мл
Промывочный буфер	Один/30 мл
Хромоген А/В/ Стоп раствор	Каждый/7 мл
<b>ПРИМЕЧАНИЕ:</b> компоненты каждого из наборов не взаимозаменяемы.	

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ, ЧТО НЕ ПОСТАВЛЯЕТСЯ

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,  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
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 стугиться природным путем. Необходимо проследить, чтобы 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 микронный фильтр. Плазма, собранная в EDTA, цитрат натрия или гепарин может тестироваться, но нельзя использовать высоко липемические, иктерические или гемолизованные образцы, что могут дать фальшивые результаты. Не нагревайте инактивированные образцы. Это может вызвать ухудшение образцов.
2. **Транспортирование и хранение:** Храните образцы при  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Избегайте многократных замораживания/оттаивания.

## СПЕЦИАЛЬНЫЕ УКАЗАНИЯ 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.
6. При аспирации жидкости из ячеек, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
7. Концентрированный моющий буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного

планшета смешайте 30 мл концентрата с 570 мл воды с конечным объемом до 600 мл. 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  $2-8^{\circ}\text{C}$ , **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ ТОЛЬКО для диагностики IN VITRO.

## ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

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

1. Не меняйте реагенты разных лотов и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
2. Убедитесь, что все реагенты соответствуют своему лоту. Не используйте реагенты после истечения срока пригодности.
3. Приведите реагенты к комнатной температуре ( $18-30^{\circ}\text{C}$ ) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
4. Используйте только необходимое количество образца, как указана в этапах процедуры. Невыполнение данных требований может привести к низкой чувствительности анализа.
5. Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности ячеек; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что ячейки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания ячеек после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении реагентов.
8. Избегайте длительных перерывов между этапами процедуры, соблюдайте одинаковые рабочие условия для всех ячеек.
9. Калибруйте пипетки часто, для обеспечения точности распределения образцов/реагентов. Используйте всегда разные наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
10. Рекомендуется использование автоматических пипеток.
11. Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна  $37^{\circ}\text{C}$ .
12. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну ячеек.
13. При измерении планшетным ридером, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
14. Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированы. Строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
15. Наконечники пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавать 1 час при  $121^{\circ}\text{C}$  или обработать 10% гипохлоридом натрия в течение 30 минут.
16. Стоп раствор является сильной кислотой. ЯДОВИТЫЙ. Используйте осторожно. При попадании на кожу или в глаза немедленно

промойте водой. ProClin 300, что используется в качестве консерванта, может вызывать раздражение кожи.

17. На ферментную активность HRP-конъюгата могут влиять пыль и реактивные химикалии и вещества, как гипохлорид натрия, кислоты, щелочи и т.п. Не проводите анализ при присутствии этих веществ.
18. При использовании полностью автоматической микропланшетной системы в процессе инкубации, не накрывайте планшеты планшеточной крышкой. Планшет можно тоже не накрывать после промывки.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C). Проверьте концентрат мощного буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный мощный буфер 1:20 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления мощного буфера.
2. **Число ячеек:** Поместите необходимые стрипы в держатель, что включают ячейки для трех отрицательных контролей, двух положительных и одного Пустого (A1, в Пустую ячейку не добавляются ни образцы, ни HRP-конъюгат). При использовании планшетного ридера с двумя волнами, требования к использованию Пустой ячейки не предъявляются. Используйте только необходимое число стрипов.  
(Таблицу-схему распределения контролей образцов см. в оригинале инструкции)
3. **Добавление образца и HRP-конъюгата:** Добавьте 50 мкл положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие ячейки. **Примечание: используйте отдельные 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.
4. **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.
5. **Промывание:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте крышку. Промойте каждую ячейку 5 раз мощным буфером. Каждый раз выдержите ячейку 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
6. **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.
7. **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.

8. **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 течении 5 минут после остановки реакции).

Сводка процедуры анализа	
Добавить образец	50 мкл
Добавить HRP-конъюгат	50 мкл
Инкубировать	60 мин.
Промыть	5 раз
Окраска	50 мкл А+50 мкл В
Инкубировать	15 раз
Остановка реакции	50 мкл стоп раствор
Считать абсорбцию	450 нм или 450/630 нм

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Каждый планшет должен приниматься отдельно, несмотря на количество анализируемый планшетов. Результаты вычисляются как отношение ОП образца к величине исключения (СО). 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 величины исключения (СО) = \*Nc+2,1

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

**Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже 0,05, принимайте ее как 0,05. Если выше 0,05, смотрите диапазон контроля качества.**

#### Пример:

##### ▪ Вычисление Nc:

№ ячейки	B1	C1	D1
ОП отриц. контроля	0,02	0,012	0,016

Nc=0,016 (Среднее значение ниже 0,05, поэтому его взяли как 0,05)

##### ▪ Вычисление величины исключения (СО) = 0,05 + 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, что каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

- Значение ОП Пустой ячейки, которая содержит в себе только Хромогены и Стоп раствор, является ниже 0,080 при 450 нм.

- Значение ОП Положительного контроля должна быть равна или больше чем 0,080 при 450/630 нм или при 450 нм после гашения.
- Значение ОП Отрицательного контроля должна быть меньше чем 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после гашения.

### 3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция (ОП) 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

Этот анализ стандартизирован против установленных стандартов, что поставляются лабораторией иммунологических продуктов от министерства здравоохранения.

**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.

Специфичность	Образцы	—	+
Доноры крови	4360	4346	14
Пациенты	150	132	18
ВСЕГО	4510	4478	32
	Подтвержд. положит.	Специф-ть	Ошибочно положит.
Доноры крови	9	99,86%	5
Пациенты	18	100%	0
ВСЕГО	32	99,93	5

**Клиническая чувствительность:** 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 HBsAg, HBeAg, анти-HBs, анти-Hbe и анти-Hbc. Лицензированный HBeAg тест использовался как подтверждение анализа. Оценка результатов дана

ниже. Результаты, полученные в индивидуальной лаборатории, могут отличаться.

Чувствительность	Образцы	—	+
Острая	378	172	206
Хроническая	347	162	185
Восстановление	88	63	25
ВСЕГО	813	397	416
	Подтвержд. положит.	Чувст-ть	Фальшиво отрицател.
Острая	200	100%	0
Хроническая	400	99,75%	1
Восстановление	5	100%	0
ВСЕГО			

### Аналитическая специфичность:

1. Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных вирусом гепатита А, С ВИЧ, цитомегаловирус и ТР.
2. Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.
3. Не наблюдались побочных эффектов до концентрации к HBeAg 150000 нг/мл при клинических тестированиях.
4. Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Репродуктивность		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

Репродуктивность		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

### ОГРАНИЧЕНИЕ

1. Неповторяемые положительные результаты могут появляться благодаря основным биологическим характеристикам метода ELISA. Набор разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и точности. Однако в редких случаях некоторые мутанты вируса гепатита В или субтипы могут оставаться неопределяемыми. Антитела могут не быть определяемыми во время ранней стадии заболевания и в индивидов с ослабленным иммунитетом.
2. Если после проведения повторного анализа первично реактивных образцов его результаты остаются отрицательными, эти образцы должны считаться неповторяемые (ошибочно положительными) и приниматься как отрицательные. Как и во многих очень чувствительных анализах ELISA, ошибочные положительные результаты могут возникать по некоторым причинам, большинство из которых относятся к, но не ограничиваются несоответствующим промывочным шагом.
3. Любой положительный результат должен интерпретироваться с интерпретироваться с клинической информацией и данными лабораторных исследований.

4. Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные этапы процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, время, количество. Свойства реагента и качество.
5. Преобладание маркера влияет на величины анализа.
6. Данный набор предназначен ТОЛЬКО для анализа образца сыворотки или плазмы. Не использовать для анализа трупных образцов, слюны, мочи или других жидкостей тела или смешанной крови.
7. Анализ является количественным и результаты не могут использоваться для измерения концентрации антигенов.

#### **ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ**

1. Показатели Положительного и Отрицательного контролей, выходящие за указанные пределы Контроля качества, демонстрируют возможное ухудшение качества реагентов и/или ошибки оператора или оборудования. В таком случае результаты должны считаться недействительными и образцы должны пройти повторный анализ. В случае наблюдения постоянных ошибочных результатов, которые относятся к ухудшению качества реагентов или их нестабильности, немедленно замените реагенты новыми.
2. Если после смешивания растворов Хромоген А и В цвет смеси в ячейках становится синим в течении нескольких минут, не продолжайте тестирование и замените реагенты новыми.

**Срок годности: не использовать набор по истечении срока годности указанного на коробке набора и этикетках реагента.**

#### ***Информация для заказа:***

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
**ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005**  
**Тел.: (0342) 775122**  
**Факс: (0342) 775612**  
**E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)**  
**[www.diameb.com](http://www.diameb.com)**