REF **В-951** Σ **96**

# И Н С Т Р У К Ц И Я
## по применению набора реагентов «ДС-ИФА-HBeAg»
## Тест-система иммуноферментная для выявления е-антигена вируса гепатита В (HBeAg)

Состав набора:

Иммуносорбент – поликлональные антитела козы к HBeAg (анти-HBe), сорбированные на стрипах полистиролового 96-луночного разборного;

Конъюгат (концентрат х 11), жидкий – поликлональные анти-HBe, меченные пероксидазой хрена;

К+ (контрольный положительный образец), жидкий – рекомбинантный HBeAg в буферном растворе;

К- (контрольный отрицательный образец), жидкий – сыворотка крови человека, не содержащая HBeAg, HBsAg, антитела к ВИЧ-1,2 и вирусу гепатита С, инактивированная;

РРК - раствор для разведения конъюгата;

АНТИ-HBe-ПЛЮС (нейтрализующий реагент), лиофилизированный или жидкий – иммуноглобулины козы, содержащие антитела к HBeAg – для постановки подтверждающего теста;

АНТИ-HBe-МИНУС (контрольный реагент), лиофилизированный или жидкий – иммуноглобулины козы, не содержащие антитела к HBeAg – для постановки подтверждающего теста;

ПР (концентрат х 25) – промывочный раствор;

СБ - субстратный буферный раствор;

ТМБ - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, жидкий;

Стоп-реагент – 0,75 М водный раствор серной кислоты.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Набор рассчитан на проведение 96 (один разборный планшет) определений, включая контрольные, предназначен для ручной постановки с возможностью дробного (по одному стрипу) использования набора или для одновременной постановки 96 определений на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

**Описание реагентов набора:**

Иммуносорбент – разборный 96-луночный полистироловый планшет с прозрачными бесцветными лунками;

Конъюгат (концентрат х 11) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-желтого цвета жидкость;

К+ (контрольный положительный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая красного цвета жидкость;

К- (контрольный отрицательный образец) - прозрачная или слегка опалесцирующая зеленого цвета жидкость;

РРК - прозрачная или слегка опалесцирующая голубого цвета жидкость;

АНТИ-HBe-ПЛЮС, лиофилизированный - сухая пористая аморфная гигроскопичная, розового цвета масса;

АНТИ-HBe-ПЛЮС, жидкий – прозрачная или слегка опалесцирующая розового цвета жидкость, допустимо образование осадка;

АНТИ-HBe-МИНУС, лиофилизированный - сухая пористая аморфная гигроскопичная, голубого цвета масса;

АНТИ-HBe-МИНУС, жидкий – прозрачная или слегка опалесцирующая голубого цвета жидкость, допустимо образование осадка;

ПР (концентрат х 25) - прозрачная или слегка опалесцирующая бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость, допустимо образование кристаллического осадка, полностью растворяющегося при температуре от 35 до 39 °С и встряхивании;

СБ - прозрачная бесцветная жидкость;

ТМБ - прозрачная бесцветная жидкость;

Стоп-реагент - прозрачная бесцветная жидкость.

## Назначение

Тест-система предназначена для выявления е-антигена вируса гепатита В (HBeAg) в сыворотке (плазме) крови человека. Может быть использована для специфической диагностики, определения активности инфекционного процесса, прогнозирования тяжести и исхода гепатита В.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

## Меры безопасности

Для изготовления контрольных образцов набора использованы термоинактивированные сыворотки. При работе с набором в лаборатории с исследуемыми образцами сывороток (плазмы) крови человека обращаться, как с потенциально инфекционным материалом: работать в резиновых перчатках, в спецодежде, не пипетировать ртом. Твёрдые отходы (использованные планшеты, наконечники к пипеткам, флаконы из-под реагентов, лабораторную посуду и т.д.) обеззараживать погружением в 6% раствор перекиси водорода с 0,5% синтетического моющего средства (СМС) или в 3% раствор хлорамина Б, или иного разрешенного к применению дез. средства. Длительность дезактивации - не менее 1 ч. Твёрдые отходы можно обезвреживать автоклавированием в течение часа при температуре от 124 до 128 °С под давлением 1,5 кГс/см$^2$ (0,15 МПа). Жидкие отходы (промывные воды) обезвреживать добавлением сухого хлорамина Б из расчёта 30 г/л (длительность дезактивации – не менее 2 ч) или кипячением в течение 30 мин, или автоклавированием в течение 1 ч под давлением 1,5 кГс/см$^2$ (0,15 МПа) и температуре от 124 до 128 °С. Инструменты и оборудование до и после работы необходимо протирать 2 раза 70% этиловым спиртом.

## Способ применения

Нельзя использовать реагенты из наборов разных серий или смешивать их в процессе приготовления растворов, а также использовать реагенты по истечении срока их годности!

Перед использованием все реагенты набора выдержать 30 мин при температуре от 18 до 24 °С. Внимание! Иммуносорбент необходимо выдержать в закрытом пакете во избежание конденсации влаги в лунках планшета.

Все растворы необходимо отбирать новыми одноразовыми наконечниками, не допускать касания жидкости в наконечнике краем дозатора!

Для отбора проб использовать калиброванные пипетки переменного объема (одно- и многоканальные) с погрешностью измерения не более 5%.

Посуду для работы с субстратной смесью (ванночки, флаконы и т.д.) в случае повторного использования необходимо сразу после работы промыть 70% раствором этилового спирта, а затем водой дистиллированной.

### 1. Перечень оборудования, материалов и реактивов, необходимых для постановки ИФА.

1. Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длинах волн 450 нм и 620-680 нм.
2. Пипетки переменного объема (одно- и многоканальные).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3. Наконечники одноразовые для пипеток переменного объема.
4. Термостат.
5. Устройство для промывания планшетов (вошер).
6. Автоматический анализатор для иммуноферментного анализа открытого типа.
7. Вода дистиллированная.
8. Бумага фильтровальная лабораторная.
9. Перчатки медицинские.

## 2. Приготовление рабочих растворов.

Объёмы реагентов при проведении анализа на необходимом количестве стрипов приведены в таблицах № 1 и 2

Таблица 1

**Расход реагентов набора на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа**

| Количество используемых стрипов | Рабочий промывочный раствор | | Рабочий раствор конъюгата | | СС | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ПР (конц. х25) (мл) | Вода дистиллированная (мл) | Конъюгат (конц. х 11) (мл) | РРК (мл) | ТМБ (мл) | СБ (мл) |
| 12 | 48,0 | 1152,0 | 1,8 | 18,0 | 1,2 | 24,0 |

Таблица 2

**Расход реагентов набора в зависимости от количества используемых стрипов при ручной постановке ИФА**

| Количество используемых стрипов | Рабочий промывочный раствор | | Рабочий раствор конъюгата | | СС | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ПР (конц. х25) (мл) | Вода дистиллированная (мл) | Конъюгат (конц. х 11) (мл) | РРК (мл) | ТМБ (мл) | СБ (мл) |
| 1 | 4,0 | 96,0 | 0,15 | 1,5 | 0,1 | 2,0 |
| 2 | 8,0 | 192,0 | 0,30 | 3,0 | 0,2 | 4,0 |
| 3 | 12,0 | 288,0 | 0,45 | 4,5 | 0,3 | 6,0 |
| 4 | 16,0 | 384,0 | 0,60 | 6,0 | 0,4 | 8,0 |
| 5 | 20,0 | 480,0 | 0,75 | 7,5 | 0,5 | 10,0 |
| 6 | 24,0 | 576,0 | 0,90 | 9,0 | 0,6 | 12,0 |
| 7 | 28,0 | 672,0 | 1,05 | 10,5 | 0,7 | 14,0 |
| 8 | 32,0 | 768,0 | 1,20 | 12,0 | 0,8 | 16,0 |
| 9 | 36,0 | 864,0 | 1,35 | 13,5 | 0,9 | 18,0 |
| 10 | 40,0 | 960,0 | 1,50 | 15,0 | 1,0 | 20,0 |
| 11 | 44,0 | 1056,0 | 1,65 | 16,5 | 1,1 | 22,0 |
| 12 | 48,0 | 1152,0 | 1,80 | 18,0 | 1,2 | 24,0 |



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

**ПР** - рабочий промывочный раствор. Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора тщательно перемешать. Для приготовления рабочего промывочного раствора необходимое количество концентрата промывочного раствора отобрать в отдельную ёмкость и добавить соответствующее количество воды дистиллированной (согласно табл. № 1, 2). Полученный раствор тщательно перемешать.

Хранение: рабочий промывочный раствор хранить не более 3-х сут при температуре от 2 до 8 °С.

**К+** - контрольный положительный образец, готов к применению.

**К-** - контрольный отрицательный образец, готов к применению.

**РРК** - раствор для разведения конъюгата, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

**Конъюгат,** рабочий раствор, готовить перед использованием. Необходимое количество тщательно перемешанного концентрата конъюгата перенести в чистую ёмкость с соответствующим количеством РРК (согласно табл. № 1 и 2) и осторожно перемешать, не допуская вспенивания (интенсивное перемешивание не применять!).

Хранение: рабочий раствор конъюгата стабилен не более 12 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

**ТМБ** - хромоген - 3,3',5,5'-тетраметилбензидин для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

**СБ** - субстратный буферный раствор для приготовления субстратной смеси, готов к применению. Перед использованием содержимое флакона тщательно перемешать.

**СС** - субстратная смесь, готовить перед использованием. Необходимый объем ТМБ развести соответствующим объемом СБ (согласно табл. № 1 и 2), тщательно перемешать до полного растворения.

Хранение: допустимо хранение СС не более 10 ч в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С в чистых флаконах или специальной емкости, предназначенной для постановки ИФА на автоматических анализаторах для иммуноферментного анализа открытого типа.

**Субстратная смесь должна быть бесцветной!**

**Стоп – реагент** - готов к применению.

**Раствор нейтрализующего реагента (АНТИ-HBe-ПЛЮС)** – содержимое флакона с лиофилизированным АНТИ-HBe-ПЛЮС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона при тщательном перемешивании, не допуская вспенивания жидкости. Интенсивное перемешивание не применять! Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение – на протяжении срока годности набора - допустимо в замороженном состоянии при температуре не выше минус 10°С в аликвотах (не допускать замораживание и оттаивание раствора более одного раза).



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

**Раствор контрольного реагента (АНТИ-HBe-МИНУС) –** содержимое флакона с лиофилизированным АНТИ-HBe-МИНУС растворить в объеме воды дистиллированной, указанном на этикетке флакона при тщательном перемешивании, не допуская вспенивания жидкости. Интенсивное перемешивание не применять! Срок годности приготовленного раствора - не более 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение – на протяжении срока годности - допустимо в замороженном состоянии при температуре не выше минус 10°С в аликвотах (не допускать замораживание и оттаивание раствора более одного раза).

При комплектации набора жидкими компонентами нейтрализующий и контрольный реагенты готовы к применению.

Хранение: после вскрытия флаконов, оставшиеся неиспользованными реагенты набора (ПР (концентрат х 25), конъюгат (концентрат х 11), К-, К+, РРК, СБ, ТМБ, стоп-реагент, АНТИ-HBe-ПЛЮС (жидкий), АНТИ-HBe-МИНУС (жидкий)) хранить во флаконах, закрытых винтовыми крышками, на протяжении срока годности набора при температуре от 2 до 8 °С.

## 3. Подготовка исследуемых образцов.

Для исключения ложных результатов нельзя подвергать исследуемые образцы термоинактивированию, необходимо отбирать и хранить их в условиях, предотвращающих бактериальный рост. Каждый образец сыворотки следует отбирать новым наконечником! Отобранные образцы хранить не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С. Более длительное хранение допустимо при температуре не выше минус 20 °С (образцы могут подвергаться замораживанию и оттаиванию не более 1 раза). Исследование образцов с выраженным бактериальным ростом, гемолизом и гиперлипидемией не допускается, т. к. может дать неправильный результат. Образцы сыворотки (плазмы) крови, содержащие агрегаты или осадок, необходимо осветлять центрифугированием.

## 4. Проведение ИФА при ручной постановке.

4.1. Вскрыть фольгированный пакет с иммуносорбентом, отступив 1,0 см от края пакета. Вынуть из пакета рамку и необходимое количество стрипов. Пакет с неиспользованными стрипами и силикагелем тщательно герметизировать. После первого вскрытия пакета иммуносорбент стабилен в течение 1 мес. при температуре от 2 до 8 °С.

4.2. Перед использованием иммуносорбент промыть 2 раза рабочим ПР с помощью вошера (или многоканальной пипетки), осторожно заливая его до краев лунок (от 380 до 400 мкл в лунку), не допуская при этом переливания промывочного раствора через края лунок, выдерживая 40 сек и осторожно удаляя промывочный раствор в ёмкость для сбора инфицированного материала.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.3. В 3 лунки иммуносорбента внести по 50 мкл К-, в 1 лунку – 50 мкл К+. В остальные лунки внести по 50 мкл исследуемых образцов. Далее во все используемые лунки иммуносорбента добавить по 150 мкл конъюгата в рабочем разведении. При добавлении конъюгата следует избегать случайного заноса образца из одного стрипа в другой через наконечники. Планшет покрыть крышкой или защитной пленкой и выдержать в термостате в течение 1 ч при температуре (37,0 ± 0,5) °С в условиях влажной камеры.*

4.4. Содержимое лунок удалить в ёмкость для инфицированного материала и планшет промыть 4 раза рабочим ПР, как указано в п. 4.2.

4.5. Во все лунки планшета внести по 200 мкл СС и выдержать планшет в течение 30 мин в защищённом от света месте при температуре от 18 до 24 °С.

4.6. Реакцию остановить добавлением в лунки планшета по 50 мкл стоп-реагента, содержимое лунок тщательно перемешать осторожным постукиванием по краям планшета и через 2-3 мин провести учет результатов.

*В качестве влажной камеры может быть использован полиэтиленовый пакет с вложенной в него ватой (марлей) или фильтровальной бумагой, смоченной водой.

## 5. Учёт результатов.

Учет результатов провести спектрофотометрически при двух длинах волн – 450 нм и при референс-длине волны в диапазоне от 620 до 680 нм с настройкой прибора по «воздуху». Допустим учёт результатов при одной длине волны - 450 нм.

Реакцию учитывают, если среднее значение ОП в лунках с К- - не более 0,2, а в лунке с К+ - не менее 0,6.

Положительным считают образец со значением ОП равным или превышающим ОП критическое (ОП крит.).

Отрицательным считают образец со значением ОП менее ОП крит.

ОП крит. рассчитывают по формуле:

$$\text{ОП крит.} = \text{ОП К-ср.} + A,$$

где А – коэффициент, определяемый методом статистической обработки результатов постановки ИФА на предприятии-изготовителе, величину которого указывают для каждой серии в инструкции по применению, вкладываемой в коробку с набором и в паспорте на серию данного препарата*.

* «Для набора серии № 005XXX величина коэффициента А=0,200».



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Окончательный положительный результат на HBeAg следует установить после проведения подтверждающего теста. Для этого в 3 лунки иммуносорбента внести по 50 мкл образца, положительного при первичном скрининге. Первая лунка служит для повторного тестирования образца с целью исключения случайных ошибок постановки. Во вторую лунку с исследуемым образцом добавить 10 мкл контрольного реагента (АНТИ-HBe-МИНУС), в третью лунку внести 10 мкл нейтрализующего реагента (АНТИ-HBe-ПЛЮС). Далее ИФА провести, как описано в п. 4.2 – 4.6. Положительный результат считать подтвержденным, если ОП образца в лунке с АНТИ-HBe-ПЛЮС на 50 % и более меньше ОП образца в лунке с АНТИ-HBe-МИНУС.

Образцы с ОП ≥ 1,0 тестируют в подтверждающем тесте согласно данной инструкции. Образец, не подвергающийся нейтрализации, следует развести в 25 раз рабочим промывочным раствором и повторить тестирование. Если после разведения в 25 раз сохраняются высокие значения ОП и образец не подвергается нейтрализации, то рекомендуется развести исходный образец в 50 раз и снова провести анализ. Если добавление АНТИ-HBs-ПЛЮС к образцу, разведенному в 50 и более (100, 200 и т.д.) раз, вызывает снижение ОП в 2 и более раза, то образец следует считать положительным, а при снижении ОП менее, чем в 2 раза – отрицательным.

## 6. Проведение ИФА в автоматическом режиме на автоматическом анализаторе типа «TECAN Freedom EVOlyzer» производства фирмы «TECAN», Швейцария (возможна постановка на других моделях ИФА-анализаторов открытого типа).

1. Задают программу проведения ИФА и включают анализатор.
2. Приготовленный рабочий промывочный раствор заливают в предназначенную для него емкость, остальные рабочие растворы и реагенты помещают в специальные контейнеры или емкости, контрольные образцы К+ и К- - во флаконах, образцы исследуемых сывороток во флаконах или пробирках в объеме не менее 300 мкл устанавливают в соответствующие штативы анализатора; помещают в анализатор необходимое количество иммуносорбентов.
3. По окончании анализа прибор выдает протокол по результатам исследования, в котором дается характеристика каждого исследуемого образца и контрольных образцов К+ и К-.
4. Реакцию учитывают, если среднее значение ОП в лунках с К- - не более 0,2, а в лунке с К+ - не менее 0,6. Далее учет результатов проводить аналогично п. 5.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

## Форма выпуска

| | |
|---|---|
| Иммуносорбент | 1 шт. |
| Конъюгат (концентрат х 11) | 2,0 мл - 1 фл. |
| К+ | 1,0 мл - 1 фл. |
| К- | 2,0 мл - 1 фл. |
| РРК | 20,0 мл - 1 фл. |
| АНТИ- HBe – ПЛЮС – лиофилизированный или<br>АНТИ-HBe-ПЛЮС - жидкий | 1 фл.<br>1,0 мл - 1 фл. |
| АНТИ- HBe – МИНУС– лиофилизированный или<br>АНТИ-HBe-МИНУС - жидкий | 1 фл.<br>1,0 мл - 1 фл. |
| ПР (концентрат х 25) | 50,0 мл – 1 фл. |
| СБ | 25,0 мл - 1 фл. |
| ТМБ | 1,5 мл - 1 фл. |
| Стоп-реагент | 25,0 мл – 1 фл. |

Реагенты помещают в коробку картонную или пакет полиэтиленовый, куда вкладывают инструкцию по применению.

Дополнительно в комплект поставки могут быть включены:

- крышка к полистироловым 96-луночным планшетам или защитная пленка для ИФА планшетов – 1 шт.
- одноразовые наконечники - 16 шт.
- пластиковая ванночка для жидких реагентов – 2 шт.
- пластиковая скрепка для закрывания пакета с иммуносорбентом или пакет полиэтиленовый с замком zip-lock – 1 шт.

**Срок годности. Условия транспортирования и хранения.**

Срок годности набора - 12 мес.

По истечении срока годности набор использованию не подлежит.

Транспортирование наборов должно производиться при температуре от 2 до 8 °С. Допустимо транспортирование при температуре от 9 до 20 °С не более 10 сут. Замораживание не допускается.

Набор должен храниться в сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С в течение всего срока годности.

**Условие отпуска** - для диагностики «in vitro». Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на специфические и физические свойства препарата направлять в адрес предприятия-изготовителя - ООО «Научно-производственное объединение «Диагностические системы» 603093, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Яблоневая, 22, тел./факс: (831) 434-86-83 или тел.: (831) 434-97-12, 8-800-555-0300.

E-mail: info@npods.ru; www.npods.ru.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

**Дополнительная информация в соответствии с ГОСТ Р 51088-2013**

- «Набор предназначен для профессионального использования в клинической лабораторной диагностике специально обученным персоналом. При работе с набором реагентов следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования к безопасности»».
- «Реагенты набора не содержат вредных веществ в опасных концентрациях, за исключением реагентов, обозначенных символом «Внимание». При попадании на кожу или слизистые немедленно промыть большим количеством воды».
- Расшифровка символов по ГОСТ Р 15223-1-2014 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Общие требования».

 – Изготовитель, символ 5.1.1;

 – Дата изготовления (YYYY-MM), символ 5.1.3;

 – Срок годности (дата истечения срока годности в формате YYYY-MM-DD), символ 5.1.4;



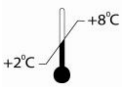
– Код партии (номер серии), символ 5.1.5;



– Номер по каталогу, символ 5.1.6;

 – Не допускать воздействия солнечного света, символ 5.3.2;

 – Беречь от влаги, символ 5.3.4;



– Температурный диапазон, символ 5.3.7;

 – Обратитесь к инструкции по применению, символ 5.4.3;

 – Внимание, символ 5.4.4;



– Медицинское изделие для диагностики *in vitro*, символ 5.5.1;

 – Содержимого достаточно для проведения *n*-количества тестов (количество определений), символ 5.5.5.



Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru