

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG К ВИРУСУ ГЕПАТИТА А

**1519-12, HAV IgG**

Каталог. № : 1519-12  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 04-09-2013



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

Анализ	HAV IgG ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурентный ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный – положительный; отрицательный контроль и пороговое значение
Образец	50 мкл
Специфичность	100 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12-18 мес.

*\*Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для медицинского заключения. Принять во внимание историю болезни пациента и дальнейшие тесты.*

## НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения IgG-антител к вирусу гепатита А в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для исследования доноров крови и для диагностики пациентов с инфекцией вируса гепатита А.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

## ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор использует твердую фазу, непрямой ELISA анализ для определения антител к HAV в двух шаговой инкубационной процедуре. Полистироловые микролуночки предварительно покрыты антителами к человеческому IgG (анти-μ цепь). Добавляются образцы сыворотки /плазмы пациентов и во время первой инкубации любые IgG антитела связываются к ячейке. После промывания всех других компонентов образца и частично IgG антител, специфический IgG, захваченный на твердой фазе определяется добавлением HAV антигенов, конъюгированных пероксидазой хрена. Во время второй инкубации, конъюгированные антигены специфически реагируют только с HAV IgG антителами и после промывания для удаления несвязанных конъюгатов, добавляется раствор хромогена. При присутствии (анти-μ)-(HAV-IgG)-(антиген-HRP) иммунокомплекс, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP конъюгата к голубому окрашенному продукту. Голубой окрас изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Количество окраса измеряется и пропорционально количеству антитела в образце. Луночки, содержащие образцы отрицательные к HAV-IgG антителам остаются бесцветными.

## Схема принципа анализа: ИФА-захват

(См. в оригинале инструкции).

## КОМПОНЕНТЫ

- **Микролуночный планшет**, зафиксированные в белом держателе пустые микролуночные полоски. Планшет запечатан в пакете из фольги с осушителем. **8x12/12 8-луночные** полоски на планшет. Каждая лунка содержит анти-IgG антитела (анти-μ цепь). Микролуночные полоски могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8 °С.
- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтая жидкость во флаконе с зеленой крышечкой.

0,5 мл во флаконе.

Протеин-стабилизирующий буфер, нереактивный к HAV IgG. Консерванты: 0,1% Проклин 300. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8 °С.

- **Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышечкой. 0,5 мл во флаконе.  
Очищенные анти-HAV IgG антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % Проклин 300. Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8 °С.
- **Реагент HRP-конъюгата, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной/оранжевой крышечкой. 3 мл в флаконе.  
HAV-IgG антитела, конъюгированные пероксидазой хрена. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с красной крышечкой. 50 мл в бутылке. PH 7,4 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента).  
**Разбавить перед использованием.** Концентрат необходимо разбавить **1:20** дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабилен 1 неделю при комнатной температуре или 2 недели при 2-8 °С.
- **Раствор хромогена А, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышечкой. 7 мл в флаконе. Раствор перекиси мочевины.  
Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8°С.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышечкой. 7 мл во флаконе. TMB раствор, TMB растворенный в лимонной кислоте. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8°С.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышечкой. 7 мл в флаконе. Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **Пластиковый герметичный пакет , 1 шт.**  
Для неиспользуемых полосок
- **Картон для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения лунок.
- **Инструкция, 1 экз.**

## ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ, ЧТО НЕ ПОСТАВЛЯЕТСЯ

1. Свежая дистиллированная или деионизированная вода
2. Одноразовые перчатки и часы
3. Контейнер для отходов.
4. Одноразовые V-образные кюветки.
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°С.
8. Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
10. Микропланшетная система для аспирации / промывания.
11. Обычный солевой раствор для разбавления образцов.

## СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна сгуститься природным путем. Необходимо проследить, что в образцы сыворотки не содержали микроорганизмов. Любые видимые частицы в образце необходимо удалить центрифугированием при 3000 об/мин. 20 минут при комнатной температуре или фильтрацией на 0,22 μ 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. **Транспортировка и хранение:** Храните образцы при 2-8°С. Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до -20°С или ниже. Избегайте многократных замораживания / оттаивания.
3. **Подготовка образцов:** Каждый образец следует разбавить 1:1000 обычным солевым раствором.

## СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВКЕ

1. Правильная процедура промывки важна для получения корректных и точных данных.
2. Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный промыватель хорошего качества. В основном требуется не менее 5 промывочных циклов при 350-400 мкл на лунку для предотвращения ошибочно положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое ячеек, а дайте возможность планшетному промывателю автоматически аспирировать его.
4. Мы рекомендуем калибровать промыватель. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносится достаточное количество объема, промывочного буфера.
5. При ручном промывании необходимо 5 циклов промывания при 350-400 мкл на лунку 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 промывочный буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного планшета смешайте 50 мл концентрата с 950 мл воды до конечного объема 1000 разбавленного промывочного буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем промывочного 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.

## ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

## ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КВАЛИФИЦИРОВАННЫМ ПЕРСОНАЛОМ

ИФА 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 (18-25°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием.
4. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
5. Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности ячеек; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания ячеек после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.
8. Избегайте длительных перерывов между шагами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех ячеек.
9. Калибруйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
10. Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
11. Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37°C.
12. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну ячеек.
13. При измерении планшетным считывателем, 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, полоски и контейнеры образцов необходимо собрать и аутоклавировать 1 час при 121°C или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
16. Стоп раствор является сильной кислотой. **ЯДОВИТЫЙ**. Используйте осторожно. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте водой. ПроКлин 300, что используется в качестве консерванта, может вызывать раздражении кожи.
17. На ферментативную 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.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Подготовка реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) за 15-30 минут. Проверьте концентрат промывочного буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный промывочный буфер 1:20 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления промывочного буфера.
2. **Нумерация лунок:** Пометьте три лунки как отрицательный контроль (напр. **B1, C1, D1**), две лунки как положительный контроль (напр. **D1, F1**) и одну как бланк. (**A1** – ни образцы ни HRP-конъюгат не должен добавляться в лунку бланка). Используйте число полосок, необходимое для теста.
3. **Добавление образца:** Добавьте **50 мкл** образцов в каждую лунку и **50 мкл** положительного и отрицательного контролей в соответствующие лунки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.**
4. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **50 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
5. **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.
6. **Промывка:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** промывочным буфером. Каждый раз выдержите лунки **30-60 секунд**. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
7. **Закрашивание:** Внесите **50 мкл** хромогена А и **50 мкл** хромогена В в каждую лунку, включая **бланк** и смешайте постукиванием по планшету. Инкубируйте планшет **15 минут при 37°C**, в темном месте. Ферментативная реакция между растворами хромогенов вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и анти-HAV IgG положительном образце.
8. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл стоп раствора** в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и анти-HAV IgG положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
9. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель лункой 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).

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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 считывателе с одним фильтром, результаты необходимо вычислять отниманием ОП лунки бланка от напечатанных величин образцов и контролей. Если считывается на планшетном считывателе с двойным фильтром, не отнимайте ОП лунки бланка от напечатанных образцов и контролей.

1. **Вычисление величины исключения (CO) =  $Nc^* \times 0,5$**   
\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

Пример:			
Вычисление Nc:			
№ лунки	B1	C1	D1
ОП отр. контроля	1,725	1,727	1,729
Nc=1,729			
Вычисление величины исключения (CO) = 1,727 x 0,5 = 0,863			

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**
  - Абсорбция бланка ниже 0,080 при 450 нм.
  - Абсорбция ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм или при 450 нм после бланкирования.

- Абсорбция ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после бланкирования.

### 3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция каждого образца)

**Отрицательные результаты (S/CO<1):** образцы, что дали абсорбцию ниже величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие IgG антител к вирусу гепатита А. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HAV.

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

**Граничные (S/CO=0,9-1,1):** Образцы с абсорбцией величины исключения между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на IgG антитела к HAV.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

**Чувствительность:** Клиническая чувствительность набора была оценена тестированием образцов полученных от 2432 (1092 детей и 1410 взрослых) индивидов с подозрениями на инфекцию HAV. Другая группа образцов 2180 здоровых доноров крови была протестирована для определения клинической специфичности теста. Эти оценки были проведены при прямом сравнении с другим коммерчески доступным HAV IgG ELISA набором, используемым для подтверждения анализа. Результаты указаны внизу. Результаты, полученные в лаборатории могут отличаться от них.

#### Клиническая чувствительность:

	Дети				Чувствительность, %
	Провер.	-	+	Подтвержд.	
Не проявляющаяся инфекция	358	8	350	350	100
Неиктерическая/ иктерическая	234	18 6	50	50	100
Полное выздоровление	500	0	500	500	100
ВСЕГО	1092	19 2	900	900	100
	Взрослые				Чувствительность, %
	Провер.	-	+	Подтвержд.	
Не проявляющаяся инфекция	300	233	67	67	100
Неиктерическая / иктерическая	540	61	480	480	100
Полное выздоровление	570	0	570	570	100
ВСЕГО	1410	293	1117	1117	100

#### Клиническая специфичность:

	ДЕТИ		ВЗРОСЛЫЕ		
	Провер. / специфичность	Ошибочно положительный	Провер. / специфичность	Ошибочно положительный	
Доноры	1300 / >99%	4	145	880 / >99%	5

#### Результаты вакцинации HAV:

Время после получения первой дозы (мес.)	ОП
0	2,451
2	0,432
4	0,375
6 вторых доз (ревакцинация)	0,142
14 третьих доз (ревакцинация)	0,025

#### Аналитическая специфичность:

Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HCV, HIV, HBV, CMV и TP. Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Е/мл. На характеристики этого анализа не влияют повышенная концентрация билирубина, гемоглобина и триоплина.

Воспроизводимость	В процедуре			Между процедурами		
	К-во	Сред. ОП	КВ%	К-во	Сред. ОП	КВ%
Образец						
Отриц. контроль	10	2.474	5.1	10	2.400	5.5
Полож. контроль	10	0.023	22	10	0.027	22.9
Слабо положит.	10	0.425	8.4	10	0.450	8.9
Сильно положит.	10	0.012	21	10	0.013	21.5

### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Отрицательный результат при определении антитела не исключает возможность инфекции. Антитела могут не определяться во время ранних стадий заболевания и в некоторых иммунодепрессивных индивидов. Если после повторного анализа первично реактивных образцов результаты анализа остаются отрицательными, эти образцы необходимо считать неповторяемыми (ошибочно положительными) и интерпретировать как отрицательные. Как и в других очень чувствительных ИФА, ошибочно положительные результаты могут случаться по нескольким причинам, большинство из которых относятся, но не ограничиваются, к несоответствию стандартного этапа.
2. Распространенные ошибки: закончился срок пригодности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
3. Преобладание маркера влияет на величины анализа.
4. Это набор предназначен ТОЛЬКО для анализа отдельно взятых образцов сыворотки или плазмы. Не использовать для анализа трупных образцов, слюны, мочи или других биожидкостей или собранной (смешанной) крови.

### УКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ

1. Значения положительного или отрицательного контролей, находящиеся вне указанного диапазона контроля качества, являются указателями возможного ухудшения реагентов и/или качества работы оператора или сбоев оборудования. В таком случае результаты должны считаться недействительными и образцы должны повторно анализироваться. В случае постоянно ошибочных результатов исходя из ухудшения или нестабильности реагентов, немедленно замените реагенты другими.
2. Если после смешивания растворов хромогена А и В в лунках цвет этой смеси в течении нескольких минут становится синим, не продолжайте проведения анализа и замените реагенты свежими.

### ГОДНОСТЬ

Не использовать набор после истечения срока годности, указанного на упаковке набора и этикетках реагентов.



### 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)