

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ HBeAb

1706-12, HBeAb

Каталог. № : 1706-12
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 06-01-2006



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения антител к е-антигену (анти-HBe) в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для исследования доноров крови и для диагностики пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Этот набор использует твердую фазу, ELISA анализ для определения антител к HBe в одно шаговой инкубационной процедуре. Анти- HBe антитела, если присутствуют, конкурируют с очищенными анти- HBe антителами, мечеными пероксидазой хрена за фиксированное число HBe антигенов, предварительно привитых к ячейкам. Если анти- HBe антитела не присутствуют в образце, HRP меченные анти- HBe связываются с антигенами и несвязанный материал удаляется промыванием. Растворы хромогена А и В добавляются в ячейки и при отсутствии анти-HBe в образце, бесцветные хромогены гидролизуются связанным HRP конъюгатом до продукта голубого окраса. Голубой окрас изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Если не происходит развитие цвета или слабое развитие, то это предполагает присутствие антител к HBe в образце.

Принцип двойного сэндвича антитела

См. в оригинале инструкции на англ. языке.

КОМПОНЕНТЫ

- **Микроячейковые стрипы**, зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.
12 8-ячейковых стрипов на планшет.
Каждая ячейка содержит рекомбинант 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 в флаконе с зеленой крышкой
1 мл в флаконе
Протеин-стабилизирующий буфер, протестированный на не-реактивность к HBe.
Консерванты: 0,1% Проклин 300
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Положительный контроль, 1 фл**
Красная жидкость в флаконе с красной крышкой
1 мл в флаконе
Анти-HBe, разбавленный в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1% Проклин 300
Готовый 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 в флаконе
анти-HBeAg антитела, конъюгированные пероксидазой хрена
Готовый 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
РН 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 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 фл.**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой
7 мл в флаконе
Раствор перекиси мочевины
Готовый 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 в флаконе
ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте
Готовый 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 в флаконе
Разбавленная серная кислота (0,2 M H₂SO₄)
- **Пластиковый пакет, 1 шт.**
Для неиспользуемых стрипов
- **Картонные дощечки для накрытия планшета, 1 лист**
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- **Инструкция, 1 копия**

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±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, 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 мкм фильтре. Плазма, собранная в EDTA, цитрат натрия или гепарин может тестироваться, но нельзя использовать высоколипемические, 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.
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. 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.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

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°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
4. Используйте только необходимый объем образца, как указано в процедуре. В противном случае это приведет 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 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 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 автоклавировать 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 раздражение кожи.
17. На энзимную 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. Материалы листа данных безопасности доступны по запросу.
19. При использовании полного автоматического микропланшета, во время инкубации не накрывайте планшет накрывателем. Вытряхивание остатков внутри планшета также можно пропустить.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C). 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 1:209 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления моющего буфера.
2. **Число ячеек:** Поместите необходимые стрипы в держатель, что включают ячейки для трех отрицательных контролей, двух положительных и одного бланка (A1, в эту ячейку не добавляются на образцы, ни HRP-конъюгат). Используйте только необходимое число стрипов.
3. **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.

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 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.
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 отрицательном контроле и Анти-HBe отрицательном образце.
7. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или вручную, внесите **50 мкл** стоп раствора в каждую ячейку и смешайте постукиванием легко по планшету. В отрицательном контроле и анти-HBe отрицательном 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).

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 вниманием 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) = *Ncx0,5

*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

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.

Пример:

- Вычисление Nc:

№ ячейки	B1	C1	D1
ОП отр. контроля	1,727	1,731	1,729

Nc=1,729

- Вычисление величины исключения (СО) = 1,729 *0,5 = 0,864

2. Диапазон контроля качества

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

- Абсорбция бланка ниже **0,08** при 450 нм.
- Абсорбция ОП отрицательного контроля должна быть равна или выше **0,800**.
- Абсорбция ОП положительного контроля должна быть равна или ниже **0,100** после бланкирования.

3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция каждого образца)

Отрицательные результаты (S/CO>1): образцы, что дали абсорбцию выше величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие антител в HBV е-антигену к гепатиту В. Результат не должен использоваться один для установления статуса инфекции.

Положительные результаты (S/CO≤1): образцы дали абсорбцию ниже или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие антител к гепатиту В е-антигена. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные к анти-HBe и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В. Результат не должен использоваться один для установления статуса инфекции.

Граничные: Образцы с коэффициентом абсорбции к величине исключения между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на анти-Hbe.

ТЕСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Аналитическая специфичность

- Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HIV, HCV, CMV и TP.
- Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.
- На анализ не влияют повышенные концентрация билирубина, гемоглобина и триопина.
- Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Клиническая специфичность: клиническая специфичность была определена на панели образцов. Полученных от 980 здоровых доноров крови и 270 не диагностированных госпитализированных пациентов. Повторно реактивные образцы и образцы при подтверждении положительности установленным тестом не включены в вычисление специфичности.

Специфичность	Образцы	-	+
Доноры крови	980	955	25
Госпитализированные пациенты	270	250	20
Всего	1250	1205	45
	Подтвержд. Положитель.	Специфичность	Ложно положител.
Доноры крови	24	99,89	1
Госпит. Пациенты	9	99,6	1
Всего	33	99,74	2

Чувствительность клиническая чувствительность этого набора была вычислена на панели образцов полученных от 654 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.

Чувствительность	Образцы	-	+
Острый	367	71	296
Хронический	72	3	69
Восстановление	215	51	164
Всего	654	125	529
	Подтвержд. Положительные	Чувст-ть	Фальшиво отрицательные
Острый	96	100	0
Хронический	69	100	0
Восстановление	164	100	0
Всего	329	100	0

Воспроизводимость		Внутри тестовая	
Тип образца	№	Средняя ОП	КВ %
Слабо положительный	10	0,639	5,8
Умеренно положительный	10	0,427	7,4
Сильно положительный	10	0,011	21
Отрицательный контроль	10	2,106	4,8

Воспроизводимость		Между тестовая	
Тип образца	№	Средняя ОП	КВ %
Слабо положительный	10	0,645	6,4
Умеренно положительный	10	0,445	8,0
Сильно положительный	10	0,015	22
Отрицательный контроль	10	2,128	4,9

ОГРАНИЧЕНИЕ

- Не повторяющиеся положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности. Однако в редких случаях некоторые HBV мутанты или субтипы могут оставаться неопределяемыми. Антигены могут быть неопределяемые во время ранней стадии заболевания и в некоторых иммунокомпромисных индивидов.
- Если после тестирования изначально реактивные образцы, результаты анализа являются отрицательными, эти образцы должны рассматриваться как не воспроизводимые (фальшиво положительные) и интерпретируются как отрицательные. Как и при других очень чувствительных ELISA анализах, фальшиво

положительные результаты могут возникать по некоторым причинам, большинство из которых относится к неправильному промыванию

- Положительные результаты должны подтверждаться другим доступным методом. Любые положительные результаты должны интерпретироваться с историей пациента и другими клиническими и лабораторными данными.
- 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.
- Преобладание маркера влияет на величины анализа.
- Этот набор предназначен только для тестирования образцов сыворотки или плазмы. Не используйте для использования образцов трупа, слюны, мочи и других тел жидкости.
- Это качественный анализ и не может использоваться для измерения концентрации антител.

УКАЗАНИЕ НА НЕПРИГОДНОСТЬ РЕАГЕНТОВ.

- Значения положительного и отрицательного контролей выходят за границы контроля качества, что указывает на загрязнение реагентов и/или ошибку оператора или оборудования. В таком случае следует повторить анализ. После повторного получения неверных результатов, возьмите новые реагенты.
- Если после смешивания растворов хромогена А и хромогена В в ячейке, цвет смеси превращается на голубой в течении пяти минут, не продолжайте тестирование и замените реагенты.

Действительность: 12 месяцев со дня изготовления.

СУММИРОВАНИЕ

Добавить образец	50 мкл
Добавить HRP-конъюгат	50 мкл
Инкубировать	60 мин
Промыть	5 раз
Образование окраса	50 мкл А + 50 мкл В
Инкубировать	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
www.diameb.com