

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ЯДЕРНОМУ АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

1778-12, HbсAb IgM

Каталог. № : 1778-12
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 08-15-2013



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

Анализ	HbсAb IgM ELISA
Метод	Иммуноресорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	100 мкл сыворотки
Специфичность	99/3 %
Чувствительность	98/4 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12-18 месяцев

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Этот anti-HbсAb IgM набор является набором иммуноферментного анализа для качественного определения антител класса IgM к ядерному антигену вируса гепатита В в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для использования в клинических лабораториях для диагностики или терапии пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этим набором используется ИФА твердофазового захвата антитела с двухэтапной инкубацией. Полистироловые микролуночки предварительно покрыты антителами к человеческому IgM (анти-μ цепь). Добавляются образцы сыворотки /плазмы пациентов, и во время первой инкубации любые IgM антитела захватываются в лунке. После вымывания всех других компонентов образца и частично IgG антител, специфический IgM, захваченный в твердой фазе определяется добавлением очищенного HbсAg, меченного анти-Hbс моноклональным антителом, конъюгированным пероксидазой хрена. Во время второй инкубации, конъюгированные антигены реагируют определенно только с анти-Hbс IgM антителами и после промывания для удаления несвязанных конъюгатов добавляется раствор хромогена. В присутствии (анти-μ)-(анти-Hbс IgM)-(HbсAg-Ab (HRP)) иммунокомплекса, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP конъюгата с продуктом синего цвета. Синий окрас изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Количество окраса измеряется и пропорционально количеству антитела в образце. Лунки, содержащие образцы отрицательные к анти-Hbс IgM антителам, остаются бесцветными.

Схема принципа анализа: ИФА захвата антитела

(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 планшете.
Каждая лунка содержит анти-IgM антитела (анти-μ цепь). Микролуночные полоски могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.

- **Отрицательный контроль, 1 фл.**
Желтая жидкость в флаконе с зеленой крышкой.
0,5 мл в флаконе.
Протеин-стабилизирующий буфер, нереактивный к анти-Hbс IgM. Консерванты: 0,1% Проклин 300. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8°C.
- **Положительный контроль, 1 фл**
Красная жидкость в флаконе с красной крышкой.
0,5 мл в флаконе
Анти-Hbс IgM антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере. Консерванты: 0,1 % Проклин 300. Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Реагент HRP-конъюгата, 1 фл (12 мл)**
Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой
Очищенный HbсAg, конъюгированный пероксидазой хрена, меченный моноклональным анти-Hbс. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8°C.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с красной крышкой.
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°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 стабилен 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 стабилен 1 месяц при 2-8°C.
- **Стоп-раствор, 1 фл.**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой.
7 мл в флаконе. Разбавленная серная кислота (0,2 M H₂SO₄)
- **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 возможно загрязненных материалов.
4. Одноразовые V-образные кюветки.
5. Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
6. Промокающая 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 считыватель, одиночная 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 ОБРАЗЦОВ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна стечь природным путем. Необходимо проследить, что б 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 микронный фильтр. 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°C. Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до -20°C или ниже. Избегайте многократных замораживания / оттаивания.
3. **Приготовление образцов:** Каждый образец следует разбавить 1:1000 обычным солевым раствором.

СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВАНИЮ

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 лунок, 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 лунок, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 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

ТОЛЬКО для диагностики IN VITRO.
ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КВАЛИФИЦИРОВАННЫМ ПЕРСОНАЛОМ

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

1. Не меняйте реагенты разных партий и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
2. Убедитесь, что все реагенты соответствуют своей партии. 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 лунок; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания лунок после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.
8. Избегайте длительных перерывов между этапами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех лунок.
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 лунок.
13. При измерении планшетным считывателем, рекомендуется измерение при 450 или при 450 с референтной длиной волны 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. **Приготовление реагентов:** Приводите реагенты и образцы к комнатной температуре (18-30°C) по крайней мере 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. Пометьте три лунки как отрицательный контроль (напр. **B1, C1, D1**), две лунки как положительный контроль (напр. **E1, F1**) и одну как бланк. (**A1** – ни образцы ни HRP-конъюгат не должен добавляться в лунку бланка). Используйте число полосок, необходимое для анализа.
2. **Добавление образца:** Добавьте по **100 мкл** образцов в каждую лунку и **100 мкл** положительного и отрицательного контролей в соответствующие лунки.
Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.
3. **Инкубация (1) образца:** Накройте планшет и инкубируйте **30 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.
4. **Промывка (1):** 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.
5. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
6. **Инкубация HRP-конъюгата (2):** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37°C**.
7. **Промывка (2):** После окончания инкубации, удалите и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** разбавленным промывочным буфером как в **этапе 5**. Каждый раз выдержите лунки **30-60 секунд**. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
8. **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 хромогеном А/В вырабатывает голубой окрас в лунках положительного контроля и положительного образца анти-НВс IgM.
9. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл стоп раствора** в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В лунках положительных контролей и анти-НВс IgM положительных образцов развивается интенсивный желтый окрас.
10. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель лункой бланка и считайте абсорбцию при **450 нм**. Если используется аппарат 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). При положительном результате, развести образец 1:1000 и повторить тест.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый планшет при вычислении результатов должен рассматриваться отдельно, несмотря на количество анализируемый планшетов. Результаты вычисляются как отношение ОП образца к величине исключения (CO). 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 **порогового значения (CO) = Nc*2,1**

*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей.

Пример вычисления порогового значения:				
1. Вычисление Nc:				
№ лунки	B1	C1	D1	
ОП отр. контролей	0,02	0,012	0,016	0,016
Nc=0,016 (Среднее значение ниже 0,05, поэтому его взяли как 0,05)				
2. Вычисление величины исключения (CO) = 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

Результаты анализа считаются действительными при их соответствии критериям контроля качества. Каждой лаборатории рекомендуется устанавливать соответствующую систему контроля качества с помощью контрольного материала, аналогичного или идентичного анализируемому образцу.

- Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор, менее чем 0,080 при 450 нм.
- Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм или при 450 нм после слепой пробы.
- Значение ОП отрицательного контроля должна быть равна или ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после слепой пробы.

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 IgM антител к вирусу гепатита В ядерного антигена. 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 IgM антител к гепатиту В ядерного антигена. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HBs и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В.

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 IgM антитела к HBs.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая специфичность: анализа определена на панели образцов, полученных для 2500 здоровых доноров крови и 230 недиагностированных госпитализированных пациентов. Повторно реактивные образцы и положительные образцы, подтвержденные референсным тестом, не были включены в вычисление специфичности.

Чувствительность: Клиническая чувствительность набора была оценена тестированием образцов полученных для 548 индивидов с вирусом гепатита В с ярко выраженной клинической историей, что базируется на референсных анализах HBsAg, HBeAg, анти-HBs, анти-HBe и анти-HBc. Эта панель включает острого, хронического и восстановочного гепатита В. Лицензионный анти-HBc IgM ELISA тест использовался как подтверждающий. Полученные результаты показаны в таблице (см. в оригинале инструкции на англ. языке). Результаты, полученные в отдельных лабораториях, могут отличаться.

(Пример распространенности маркера при определенном количестве пациентов, инфицированных вирусом гепатита В см. в оригинале инструкции).

Аналитическая специфичность

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

(См. таблицу в оригинале инструкции).

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ИФА. Отрицательный результат при определении антитела не исключает возможность инфекции. Антитела могут не

определяться во время ранних стадий заболеваний и в некоторых иммунокомпромиссных 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 промывочного этапа.
- Любые 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 промывки, загрязненные реагенты, неправильные этапы процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Преобладание маркера влияет на предположительные значения анализа.
- Ошибочно отрицательные результаты могут возникать от подавления специфического IgM при присутствии высокого титра специфического IgG. Удаление IgG могут быть полезными для предотвращения ошибочно отрицательных результатов.
- 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.
- Это количественный анализ и результаты и результаты не могут быть использованы для измерения концентраций антител.

ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ

- 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.
- 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 по истечении 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
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com