

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА D (HDV-Ag)

1868-12, HDV Ag

Каталог. № : 1868-12
Количество : 96
Производитель: DAI (США)

Методика от 27-08-2013



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

Анализ	HDV Ag ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА: покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Количественный: положительный и отрицательный контроль
Образец	50 мкл
Специфичность	100%
Чувствительность	100%
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12 -14 мес.

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ИФА HDV Ag предназначен для клинической лабораторной диагностики пациентов, которые подозреваются на наличие вирусной инфекции гепатита D (HDV-Ag), а также для эпидемиологического анализа. Анализ имеет 100% чувствительность и специфичность и представляет собой твердофазный иммуноферментный анализ для качественного определения антигенов гепатита D в человеческой плазме / сыворотке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор ИФА HDV-Ag использует твердую фазу, метод двухэтапной инкубации двойного антитела типа «сэндвич». Сыворотка / плазма пациента добавляется вместе с экстракционным раствором после того, как на полистирольные микролуночные стрипы предварительно нанесены очищенные антитела, специфичные к HDV. Если вирус HDV присутствует, HDV частицы разрушаются и то, что захвачено в лунках является специфическими антигенами HDV. На этом этапе несвязанные белки сыворотки должны быть вымыты из лунок. Дальше добавляется пероксидаза хрена (HRP), конъюгированная со вторичным антителом. И снова после промывки несвязанные конъюгаты удаляются. В лунки после этого добавляются растворы хромогена, содержащие тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись мочевины. На этом этапе комбинированного присутствия сэндвич-иммунокомплекса антитело-антиген-антитело (HRP), образуется продукт синего цвета, который является результатом бесцветных хромогенов, гидролизованных связанным конъюгатом HRP. После остановки реакции серной кислотой, синий цвет изменяется на желтый. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена в образце. Бесцветные лунки появляются, когда образцы отрицательны к антигенам HDV.

Схема принципа анализа: ИФА двойных антител типа «сэндвич». (См. в оригинале инструкции).

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

Поставляемые материалы

- Микролуночные стрипы, зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.
12x8-луночных стрипов на планшет.
Каждая лунка содержит рекомбинант HDV антигенов. Микролуночные стрипы могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.

- Отрицательный контроль, 1 фл.**
Голубая жидкость во флаконе с зеленой крышкой
0,5 мл во флаконе
Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к HDV антигенам.
Консерванты: 0,1% Проклин 300
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- Положительный контроль, 1 фл**
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой
0,5 мл во флаконе
Очищенные антигены HDV, разбавленные 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 / оранжевой крышкой
12 мл во флаконе
Анти-HDV антитела, конъюгированные пероксидазой хрена.
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- Экстракционный раствор, 1 фл.**
Синий раствор в белом флаконе с черной / коричневой крышкой
6 мл во флаконе
Хаотропные агенты для разрушения вирусов во время инкубации. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- Промывочный буфер, 1 бут.**
Разбавить перед использованием
Бесцветная жидкость
50 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 во 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 во флаконе
ТМБ раствор, ТМБ 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 желтой крышкой.
8 мл во флаконе
Разбавленная серная кислота (0,2 M H₂SO₄)
Готовый к использованию
- Полиэтиленовый пакет, 1 шт.**
Для неиспользуемых стрипов
- Картон для накрытия планшета, 2 листа**
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- Инструкция, 1 копия**

Требуемые, но не поставляемые материалы

- Свежая дистиллированная или деионизированная вода
- Одноразовые перчатки и часы
- Контейнер для отходов.
- Сменный лоток V-формы.
- Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
- Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5°C.
- Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
- Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
- Микропланшетная система для аспирации / промывания.

СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна стечь естественным путем. Необходимо проследить, что в образцы сыворотки не содержались 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,

собранный 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

СПЕЦИАЛЬНЫЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОМЫВКЕ

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 лунку для предотвращения фальшиво положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое лунок, 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, 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% 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.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОФЕССИОНАЛАМИ

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 (18-25°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
4. Не допускайте высыхания лунок после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении лунок.
5. Избегайте длительных перерывов между шагами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех лунок.
6. Калибруйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
7. Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
8. Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37°C.
9. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну лунок.
10. При измерении планшетным считывателем, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
11. Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированными.
12. Материалы человеческого происхождения могут использоваться в этом наборе. Однако, строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
13. Сыворотка быка может использоваться в DA1 HDV набора. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) и сыворотка фетального теленка (FCS) взята из животных BSE/TSE свободных географических территорий.

14. Наконечники пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавать 1 час при 121°C или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
15. 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.
16. 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.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление 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. **Размещение лунок:** Поместите необходимые полоски в держатель, что включают лунки для трех отрицательных контролей (например, **B1, C1, D1**), двух положительных (напр., **E1, F1**) и одного бланка (**A1**, в эту лунку не добавляются ни образцы, ни HRP-конъюгат). Если результаты будут определяться при использовании двойной длины волны, использование бланка можно пропустить. Используйте только необходимое число полосок.
3. **Добавление образца:** Добавьте **10 мкл** положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие лунки. Добавьте в каждую лунку **10 мкл** экстракционного раствора, поставляемого с набором. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Смешайте легким постукиванием по планшету.
4. **Инкубация:** 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.
5. **Промывание:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** моющим буфером. Каждый раз выдержите лунки 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
6. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку **кроме бланка**.
7. **Инкубация HRP-конъюгата (2):** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37°C**.
8. **Промывание:** После окончания инкубации, удалите и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** разбавленным моющим буфером как в **этапе 5**.
9. **Образование окраса:** 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. Энзимная реакция между хромогеном А/В вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и anti- HDV-Ag положительном образце.
10. **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 anti- HDV положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
11. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель бланком 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 порогового значения (CO) = *Nc x 2,1

*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже 0,05, принимайте ее как 0,05.

Пример:

- Вычисление Nc:
№ ячейки B1 C1 D1
ОП отрицательных контролей 0,02 0,012 0,016
Nc = 0,016 (значение Nc ниже 0,05, его следует принимать как 0,05)
- Вычисление порогового значения (CO) = 0,05 x 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, чтобы каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответствующим анализируемым пациентам.

- Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор меньше 0,080 при 450 нм.
- Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фонового определения (бланка).
- Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фонового определения.

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 специфических антигенов вируса гепатита D. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HDV.

Положительные результаты (S/CO ≥ 1): образцы дали абсорбцию выше или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие специфических антигенов вируса гепатита D. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на антигены HDV и поэтому существует вероятность текущего инфицирования пациентов вирусом гепатита D.

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 к антигенам HDV. Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой (напр., ПЦР).

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Чувствительность: Клиническая чувствительность данного анализа была рассчитана панелью образцов, полученных от 2500 пациентов с острым и хроническим гепатитом, среди которых в 2400 образцах был обнаружен HBsAg. После тестирования HDV РВ-ПЦР 150 человек были диагностированы как инфицированные HDV. Во время тестирования с помощью этого набора ИФА 129 из тестированных HDV РВ-ПЦР, были подтверждены как положительные к HDV-Ag и 129 образцов были подтверждены как HDV-Ag положительные при тестировании другим коммерчески доступным набором ИФА HDV-Ag. Чувствительность 100 %.

Специфичность: клиническая специфичность этого анализа была оценена панелью образцов, полученных от 500 здоровых людей. Ложных положительных результатов не наблюдалось, что указывает на 100% специфичность теста.

Аналитическая специфичность:

Влияния не наблюдалось при тестировании пациентов с другими HDV-несвязанных клиническими условиями как HIV, HBV, HCV, HAV, CMV, TP. Отсутствие взаимодействия не наблюдалось с ревматоидным фактором до 2000 Ед/мл. На характеристики качества анализа не влияют повышенные концентрации билирубина, гемоглобина и триолеина.

Сильно положит.	10	2.3	4.2	2.264	4.4
Положит. контроль	10	2.157	4.0	2.012	4.1

ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности и «непрямая модель» минимизирует неспецифические реакции, что может проявляться через влияние между неизвестными частицами в образце и кроличьими анти-человеческими IgG, что используются как конъюгат. Антитела могут не определяться на ранних стадиях заболевания и в некоторых иммунокомпromисных индивидов.
- 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 пригодности, 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.

ГОДНОСТЬ

Не используйте реагенты 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
www.diameb.com

Воспроизводимость	К-во	В процедуре		Между процедурами	
		Средняя ОП	КВ%	Средняя ОП	КВ%
Тип образца					
Слабо положит.	10	0.257	9.0	0.205	9.5
Умеренно положит.	10	1.09	7.0	9.531	7.5