

# НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ ГЕПАТИТА D (HDV)

**1869-12, HDV IgM**

Каталог. № : 1869-12  
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 IgM ELISA   |
|----------------------|---|
| Метод                | Иммунсорбентный 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   |
| 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

Настоящий набор ИФА предназначен для клинической лабораторной диагностики и лечения пациентов с подозрением на инфицирование вирусом гепатита D. Этот набор является иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов для качественного определения антител IgM-класса к вирусу гепатита D в человеческой сыворотке/плазме.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

## ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набором ИФА HDV IgM используется твердая фаза, двухэтапную инкубацию и захвата антител. Антитела направлены на человеческий IgM (анти-и цепь) и предварительно нанесены на полистирольные стрипы. В течение первой стадии инкубации и после разбавления сыворотки или плазмы пациента, любые присутствующие антитела IgM-класса будут захвачены в лунках. Далее, все другие компоненты образца вымываются, особенно любые антитела IgG. Что становится видимым после добавления очищенных антигенов HDV конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), это отчетливые антитела IgM-класса к HDV захваченные на твердой фазе. В ходе второй инкубации конъюгированные антигены будут индивидуально реагировать исключительно на конкретные антитела IgM-класса к HDV. Промывание лунок для удаления несвязанных конъюгатов важно на данном этапе, поскольку конъюгированные антигены могут индивидуально реагировать только с конкретными антителами IgM-класса к HDV. В этот момент когда присутствует иммунокомплекс (анти-и)-(HDV-IgM)-(HDV антиген-HRP), образуется продукт синего цвета, который является результатом бесцветных хромогенов, гидролизуемых связанным конъюгатом HRP. После остановки реакции серной кислотой синий цвет изменяется на желтый. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антител в образце. Бесцветные лунки появляются, когда образцы являются отрицательными к HDV-IgM.

## Схема принципа анализа: ИФА захват 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 планшет. Каждая лунка содержит анти-IgM антитела (анти-

цепочка). Микролуночные полоски могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8 °С.

- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтоватая жидкость во флаконе с зеленой крышкой. 0,5 мл во флаконе.  
Протеин-стабилизирующий буфер, нереактивный к HDV IgM. 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 крышкой. 0,5 мл во флаконе.  
Очищенные анти-HDV IgM 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 крышкой. 12 мл во флаконе.  
Антигены HDV, конъюгированные пероксидазой хрена. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Разбавитель образцов, 1 фл.**  
Синяя жидкость в белом флаконе с синей крышкой. 12 мл во флаконе.  
Буферный раствор протеина.  
Консерванты: 0,1% Проклин 300.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**  
Бесцветная жидкость в прозрачном флаконе с белой 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 2 недели при комнатной температуре или 2 недели при 2-8 °С.
- **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 стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **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 стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой. 7 мл во 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

- Свежая дистиллированная или деионизированная вода
- Одноразовые перчатки и часы
- Контейнер для отходов.
- Одноразовые V-образные кюветки.
- Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
- Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
- Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5 °С.
- Микршейкер 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.
- 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 стечь природным путем. Необходимо проследить, что 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 м 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.

- 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.
- Подготовка образцов:** Каждый образец должен быть разбавлен 1:10 обычным солевым раствором.

#### СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВКЕ

- Правильная процедура промывки важна для получения корректных и точных данных.
- 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.
- Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое ячеек, а дайте возможность планшетному промывателю автоматически аспирировать его.
- 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.
- 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.
- При аспирации жидкости из ячеек, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорита натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
- 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

**Данный набор предназначен только для диагностики ин-витро! ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.**

Данный анализ является методом, чувствительным к времени и температуре. Чтобы избежать ложных результатов, строго придерживайтесь процедуры схемы анализа, не изменяя ее.

- Не используйте реагенты с разных лотов или других наборов. Компоненты набора подобраны точно, чтобы обеспечить максимальную результативность анализа.
- Уверьтесь в том, что срок годности реагентов не истек, а также, что они из одного лота. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности, указанного на этикетках реагентов или упаковке набора.
- ВНИМАНИЕ – КРИТИЧЕСКИЙ ШАГ:** Все реагенты и образцы необходимо привести к комнатной температуре (18-30°) до начала теста. Слегка встряхните реагент перед использованием, и верните к температуре 2-8°C сразу после использования.
- используйте только достаточное количество образцов, как указано в схеме анализа. В противном случае чувствительность анализа может оказаться очень низкой.
- Не касайтесь внешней стороны дна лунок; отпечатки пальцев или царапины могут препятствовать считыванию.
- При считывании результатов уверьтесь в том, что дно планшета сухое, а внутри лунок нету воздушных пузырьков.
- Никогда не давайте лункам микропланшета высохнуть после промывания. Переходите немедленно к следующему этапу. При добавлении реагентов избегайте образования воздушных пузырьков.
- Избегайте длительных пауз между этапами анализа. Обеспечьте одинаковые рабочие условия для всех лунок.
- Часто калибруйте пипетки, чтобы обеспечить точность дозирования образцов/реагентов. Всегда используйте новые одноразовые наконечники для каждого образца и реагента во избежание перекрестной контаминации. Никогда не пипетируйте растворы ртом. Рекомендуется использование автоматических пипеток.
- Уверьтесь в том, что инкубационная температура внутри инкубатора составляет 37°C.
- Добавляя образцы, избегайте касания наконечника пипетки дна лунок.

- При считывании результатов планшетным ридером, рекомендуется установить абсорбцию при 450нм или при 450 нм со ссылкой на 630 нм.
- Обращайтесь со всеми реагентами и образцами человеческого происхождения как с потенциально инфицированными.
- В наборе могли быть использованы материалы человеческого происхождения. Они тестировались наборами высокой результативности и являются отрицательными к антителам HTLV 1/2, вирусу гепатита С, TP и поверхностному антигену вируса гепатита В. Однако, не существует аналитического метода, способного уверить в полном отсутствии возбудителя инфекции в образцах или реагентах. Поэтому необходимо очень аккуратно обращаться с реагентами и образцами. Строгое соблюдение правил лабораторной практики может обеспечить личную безопасность. Никогда не ежьте, не пейте, не курите и не наносите косметику в лаборатории.
- В данном наборе могла использоваться бычья сыворотка. Альбумин бычьей сыворотки и сыворотка зародыша теленка взяты у животных, проживающих в географических зонах, безопасных по отношению к возможности заражения ГЭ КРС и ТГЭ.
- Перед дальнейшей утилизацией все наконечники для пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры для образцов необходимо собрать и подвергнуть паровой стерилизации на протяжении 1 часа при температуре 121°C, либо же обработать гипохлоритом натрия на протяжении 30 минут с целью обеззараживания.
- Стоп-раствор (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) является сильной кислотой. Едкий. Использовать осторожно. В случае попадания капель на кожу или в глаза, немедленно вытереть или промыть водой. Консервант ProClin 300 может вызывать чувствительность кожи.
- Ферментативная активность конъюгата пероксидазы хрена может пострадать от пыли, реактивных химикатов, растворов типа гипохлорита натрия, кислоты, щелочей и т.д. НЕ проводить анализ в присутствии данных веществ.
- Сертификат безопасности материала доступен по требованию.
- В случае использования полностью автоматизированной системы обработки данных микропланшета, не накрывайте планшет крышечкой во время инкубации. Можно также упустить выбивание остатков из планшета после промывания.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 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. 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 теста.
- Разбавление образцов:** перед добавлением разбавить каждый образец 10X обычным солевым раствором.
- Добавление образцов:** Внесите **100 мкл** поставляемого разбавителя образца в каждую лунку кроме лунок для положительного, отрицательного контролей и бланка. Добавить в каждую лунку пл **10 мкл** образцов, разведенных солевым раствором и по **100 мкл** контролей в соответствующие лунки. Перемешать осторожным постукиванием по планшету. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.**
- 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.
- 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.
- Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
- Инкубация:** Накройте планшет и инкубируйте **30 минут при 37°C** как указано в п. 4.
- Промывка:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** промывочным буфером как указано в п. 5.
- 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-HDV IgM положительном образце.

10. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или вручную, внесите **50 мкл стоп раствора** в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и анти-HDV IgM положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
11. **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 (СО) = $Nc * x 2,1$

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

| Пример:  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| Вычисление Nc:   |       |       |       |
| № лунки  | B1    | C1    | D1    |
| ОП отр. контроля   | 0,014 | 0,012 | 0,016 |
| Nc= 0,016  |       |       |       |
| (Nc ниже 0,05, таким образом принимать как 0.05)           |       |       |       |
| Вычисление величины исключения (СО) = $0,05 + 2,1 = 0,105$ |       |       |       |

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

- 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 IgM антител к вирусу гепатита D. Результаты настоящего анализа не должны использоваться в одиночку для подтверждения инфекционного статуса.

**Положительные результаты (S/CO≥1):** образцы с абсорбцией выше или равной величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие IgM антител к вирусу гепатита D. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HDV и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом С.

**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 HDV.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой.

#### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 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-ПЛР, 150 человек были диагностированы как инфицированы HDV. Во время тестирования с помощью этого набора ИФА 107 из тестированных

HDV РВ-ПЦР, были подтверждены как положительные к HDV- IgM и 107 образцов были подтверждены как HDV-IgM положительные при тестировании другим коммерчески доступным набором ИФА HDV IgM. 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:

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

| Воспроизводимость | К-во | В процедуре |     | Между процедурами |     |
|-------------------|------|-------------|-----|-------------------|-----|
|                   |      | Средняя ОП  | КВ% | Средняя ОП        | КВ% |
| Тип образца       |      |             |     |                   |     |
| Слабо положит.    | 10   | 0,257       | 8,1 | 0,221             | 8,3 |
| Умеренно положит. | 10   | 0,978       | 7,3 | 0,904             | 7,5 |
| Сильно положит.   | 10   | 1,856       | 4,6 | 1,782             | 4,7 |
| Положит. контроль | 10   | 1,948       | 4,2 | 1,901             | 4,3 |

#### 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 заболеваний и в некоторых иммунодепрессивных индивидов.
2. Все положительные результаты необходимо подтверждать другими имеющимися методами и интерпретировать, принимая во внимание клиническую информацию о пациенте.
3. 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.
4. Преобладание маркера влияет на величины анализа.

#### ГОДНОСТЬ

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

ЛИТЕРАТУРА (См. в оригинале инструкции).

#### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»  
 ООО «БИОТЕХЛАБ»  
 ул. Чорновола, 97  
 г. Ивано-Франковск, 76005  
 тел.: +38 (0342) 775 122  
 факс: +38 (0342) 775 123  
 e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)