

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

**1870-12, HDV IgG**

Каталог. № : 1870-12  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 01-02-2006



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 вирусу гепатита D в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для исследования и для диагностики пациентов с инфекцией вируса гепатита D.

## ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Этот набор использует твердую фазу, ELISA анализ для определения антител к HDV в одно шаговой инкубационной процедуре. Анти-HDV антитела, если присутствуют, конкурируют с поликлональными анти-HDV антителами, мечеными пероксидазой хрена за фиксированное число HDV антигенов, предварительно привитых к ячейкам. Если анти-HDV антитела не присутствуют в образце, HRP меченные анти-HDV связываются с антигенами и несвязанный материал удаляется промыванием. Растворы хромогена А и В добавляются в ячейки и при отсутствии анти- HDV 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 HDV в образце.

## Схема принципа анализа:

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 планшете.  
Каждая ячейка содержит очищенный HDV антигенов. Микроячейковые стрипы могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные ячейки 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, протестированный на не-реактивность к анти-HDV.  
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  
0,5 мл в флаконе  
анти-HDV 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 мл в флаконе  
Анти-HDV, 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  
50 мл в бутылке  
РН 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)  
Концентрат необходимо разбавить 1:19  
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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Готовый к использованию
- **Пластиковый пакет, 1 шт.**  
Для неиспользуемых стрипов
- **Картонные дощечки для накрытия планшета, 2 листа**  
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, собранная 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 и 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. **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 мощных 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 1:19 перед использованием. Для одного планшета смешайте 50 мл

концентрата с 950 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 (18-25°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 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 автоклавать 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.

## ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-25 °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 1:19 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 ни образцы, ни HRP-конъюгат). Используйте только необходимое число стрипов.
3. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте 50 мкл антитела HRP-конъюгата в каждую ячейку кроме бланка.
4. **Добавление образца:** Добавьте 10 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.** Смешайте легким постукиванием по планшету.
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. **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.
7. **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 А/В вырабатывает голубой окрас в отрицательном контроле и отрицательном образце.
8. **Остановка реакции:** Удалите и уничтожьте планшетный накрыватель. Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл стоп раствора** в каждую ячейку и смешайте постукиванием легко по планшету. В отрицательном контроле и отрицательном образце развивается интенсивный желтый окрас.
9. **Измерение абсорбции:** Калибрируйте 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 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 ридере с одним фильтром, результаты необходимо вычислять отниманием 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) = Nc\*0,5**

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

#### **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

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, что б каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

- Абсорбция бланка ниже 0,080 при 450 нм.
- Абсорбция ОП отрицательного контроля должна быть равна или выше 0,800 после бланкирования.
- Абсорбция ОП положительного контроля должна быть ниже 0,08 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 к HDV. Поэтому, нет указаний на возможную прошлую или текущую инфекцию HDV.

**Положительные результаты (S/CO ≤ 1):** образцы дали абсорбцию ниже или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие антитела к HDV. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на анти-HDV и поэтому пациенты, возможна прошлая или текущая инфекция, инфицированные вирусом гепатитом D.

**Граничные (S/CO = 0,9-1,1):** Образцы с абсорбцией между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на анти-HDV.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой (напр. PCR, WB).

#### ТЕСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Набор стандартизирован при использовании анти-HDV контроля качества положительной сыворотки, полученной от HDV пациентов.

**Чувствительность:** Клиническая чувствительность анализа была вычислена на панели образцов, полученных от 2500 пациентов с острым и хроническим гепатитом В. В этой панели 2400 образцов были обнаружены как положительные на HbsAg. После тестирования HDV RT-PCR, в 150 индивидов был поставлен диагноз инфекции HDV. После тестирования с анти-HDV ELISA набором, для 48 RT-PCR было подтверждено положительность на гепатит D образцов, для которых было обнаружено положительность анти-HDV и 48 образцов было подтверждено на положительность анти-HDV при тестировании другим коммерчески доступным анти-HDV ELISA набором. Чувствительность установлена 100 %.

**Специфичность:** Клиническая специфичность анализа была оценена на панели образцов 500 здоровых индивидов. Не было получено фальшиво положительных результатов, что указывает на 100 % специфичность теста.

#### Аналитическая специфичность

1. Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HCV, HIV, HBV, HTLV, CMV и TP.
2. Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.
3. На характеристики этого анализа не влияют повышенная концентрация билирубина, гемоглобина и триопина.
4. Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Воспроизводимость	Внутри тестовая		
	№	Средняя ОП	КВ%
Образец			
Слабо положительный	10	0,639	5,8
Средне положительный	10	0,427	7,4
Сильно положительный	10	0,011	21
Отрицательный контроль	10	1,938	4,2

Воспроизводимость	Между тестовая		
	Тест	Средняя ОП	КВ%
Образец			
Слабо положительный	10	0,645	6,4
Средне положительный	10	0,436	8,0
Сильно положительный	10	0,015	22
Отрицательный контроль	10	1,891	4,3

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Неповторяющиеся положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности. Однако в редких случаях некоторые HDV мутанты или подтипы остаются неопределяемыми. Антитела могут не определяться на ранних стадиях заболевания и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.
2. Любые положительные результаты должны интерпретироваться с историей пациента и другими клиническими и лабораторными данными.
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: 12 месяцев из дня изготовления.**

ООО «ДИАМЕБ»  
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)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)



**ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

© Перевод на русский язык ООО «ДИАМЕБ»