



## Набор для определения специфических антител к вирусу Гепатита А IgM в человеческой сыворотке или плазме. HAV-IgM

Кат. номер : E-HAM-1P  
Количество : 48

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

Методика 08-2006

### НАЗНАЧЕНИЕ

1. Используется как метод диагноза вирусного гепатита.
2. Для исследования гуморальной иммунной реакции на вирус гепатита А.
3. Для скрининга состояния анти-HAV-IgM перед вакцинацией.

### ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест основан на принципе ферментного иммуноанализа захвата антител.

Кроличьи анти-человеческие-IgMμ-цепь---анти-HAV-IgM---анти-HAV-HRP+субстрат.

Твердофазное антитело	Полож. образец	Антиген антитело	Фермент-меченное
-----------------------	----------------	------------------	------------------

### ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

Полистироловые микроячейки предварительно покрыты кроличьими антителами к человеческому IgM (анти-μ цепь). Добавляются образцы сыворотки /плазмы пациентов и во время первой инкубации любые IgM антитела связываются к ячейке. После промывания всех других компонентов образца и частично IgG антител, специфический IgM, захваченный на твердой фазе определяется добавлением HAV антигенов, конъюгированных пероксидазой хрена. Во время второй инкубации, конъюгированные антигены специфически реагируют только с HAV IgM антителами и после промывания для удаления несвязанных конъюгатов, добавляется раствор хромогена. При присутствии (анти-μ)-(HAV-IgM)-(антиген-HRP) иммунокомплекс, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP конъюгата к голубому окрашенному продукту. Голубой окрас изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Количество окраса измеряется и пропорционально количеству антитела в образце. Ячейки, содержащие образцы отрицательные к HAV-IgM антителам остаются бесцветными.

### КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микроячейковые стрипы:** 1 планшет (48 тестов) 6 8-луночных полосок или и 12-луночных на планшет. Планшет 12 8-ячейковых стрипов на планшет. Каждая ячейка содержит анти-IgM антитела (анти-μ цепь и запечатана в алюминиевом пакете с осушителем.
2. **Конъюгат:** 1 фл./3,2 мл анти-HAV-HRP
3. **Положительный контроль:** 1 фл./1,0 мл.
4. **Отрицательный контроль:** 1 фл./1,0 мл.
5. **Моющий буфер:** 1 бут./30 мл в бутылке, концентрированный. Разбавлять 1:25 непосредственно перед использованием.

6. **Хромоген А:** 1 фл./4 мл (содержащий гидропероксид).
7. **Хромогена В:** фл./4 мл (содержащий ТМВ).
8. **Стоп раствор:** 1 фл./3,5 мл (2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
9. **HAVAg:** 1 фл./2,2 мл.
10. **Планшет:** 2 шт.
11. **инструкция пользователя:** 1 копия.

### ТРЕБУЕМЫЕ НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дистиллированная вода и обычный солевой раствор.
2. Пипетки на 10 мкл. 50 мкл, 1000 мкл и т.д.
3. Одноразовые насадки для пипеток.
4. Инкубатор (37°C).
5. Микропланшетный промыватель.
6. Микропланшетный ридер с длиной волны 450 нм.
7. Абсорбирующая ткань.
8. Таймер.
9. Перчатки.
10. Микропланшетный миксер.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Образцы сыворотки или плазмы для тестирования могут содержать инфекционные носители, например, вирус гепатита А.
2. Не выставлять ТМВ реагенты под сильных свет в течении хранения или инкубации.
3. Не пипетировать ртом.
4. Удалять все образцы и материалы для проведения теста, как с потенциально инфекционными агентами вирусного гепатита. Используемый метод дезинфекции – автоклавирование в течении минимум одного часа при 121.5°C. Нейтрализованные жидкие отходы не содержащие кислоты могут быть смешаны с гипохлоридом натрия в количестве, чтобы конечная смесь содержала 1,0% гипохлорида натрия. Для эффективной дезинфекции необходимо 30 мин.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока пригодности, указанной на этикетке при хранении при 2-8°C. Не удалять силикагелевый мешок из набора. Субстрат буфера стабилен в течении 6 мес. при 2-8°C при хранении в закрытом оригинальном флаконе для буфера субстрата.

### ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или плазма не должны быть микробиологически зараженными при анализе. Консерванты (не азид натрия), повторное замораживание и размораживание и образцы, содержащие любые видимые вещества могут дать ошибочные результаты.

### ПРИМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. В одной процедуре не меняйте ELISA полоски, конъюгат и контроли реагенты разных партий и разных наборов.
2. Не проводите тест в присутствии реактивных испарений (например, кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, поскольку это может повлиять на ферментную активность конъюгата.
3. Все сосуды, используемые для приготовления раствора субстрата должны быть тщательно очищены и в конце промыты дистиллированной водой.
4. ELISA полоску использовать только один раз.
5. Во избежание загрязнения, не касайтесь верхнего края полосок пальцами.
6. Перед использованием убедитесь, что тестовые образцы и контроли гомогенны.
7. Все этапы пипетирования должны исполняться с крайней осторожностью.

8. Во избежание загрязнения, не касайтесь краев лунок пипеткой при внесении конъюгата субстрата.
9. Проверьте наличие воздушных пузырей в лунках после всех этапов пипетирования. При их наличии, удалите, например, легким похлопыванием.
10. Если нет возможности немедленно после промывки заполнить лунки конъюгатом или субстратом, полоски можно положить обратной стороной на влажную абсорбирующую ткань не более чем на 15 минут.

#### ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

Недостаточная промывка отрицательно повлияет на результат теста. Следует тщательно соблюдать рабочие инструкции по эксплуатации промывочного оборудования. Полностью аспирируйте жидкость из всех лунок, наклоня насадку аспирационной пипетки ко дну каждой лунки. Старайтесь не поцарапать внутренность лунки. После аспирации заполните лунки 0,4 мл разбавленного промывочного буфера. Аспирируйте жидкость по крайней мере через 10 сек. после заполнения.

Проведите эти наклоны 3 или 5 раз. После конечной аспирации процедура промывки заканчивается высушиванием верхнего края ELISA полосок и их держателя абсорбирующей тканью. При отсутствии автоматического промывателя, промывку можно делать вручную.

#### ПРИГОТОВЛЕНИЕ

1. Концентрированный промывочный буфер необходимо привести к температуре окружающей среды.
2. Разбавьте концентрированным промывочный буфер 1:25 дистиллированной водой. Дайте всем тестовым образцам, контролям и пакету, содержащему ELISA полоски достичь температуры окружающей среды перед использованием.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Откройте пакет из фольги и извлеките держатель для полосок с соответствующим количеством ELISA полосок. В процессе анализа полоски остаются в держателе. Полоски можно пометить от нижнего края.
2. Разбавьте каждый образец **1:1000** обычным солевым раствором. Внесите **5 мкл** образца к **5 мл** 0,15M обычного солевого раствора в стеклянные тестовые пробирки, тщательно перемешайте. Не разбавляйте контроли.
3. Добавьте **100 мкл** каждого разбавленного образца в ячейки. Оставьте две лунки для отрицательного контроля, две лунки для положительного контроля и одну лунку для бланка. Внесите **100 мкл** контролей после добавления образцов.
4. Накройте полоски накрывателем для планшета и инкубируйте **20 минут при 37°C**.
5. **Промывание:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую ячейку **3 раза** моющим буфером. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
6. **Внесите 35 мкл** HAVAg раствора в каждую лунку (кроме бланка).
7. Внесите **50 мкл** конъюгата в каждую лунку (кроме бланка).
8. Накройте планшет новым накрывателем и инкубируйте **20 минут при 37°C**.
9. Промойте каждую ячейку **5 раз**, затем переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
10. Внесите **50 мкл** хромогена А и **50 мкл** хромогена В в каждую ячейку, включая **бланк**.
11. Инкубируйте планшет **10 минут при 37°C**.
12. Остановите реакцию путем внесения **50 мкл стоп раствора** в каждую ячейку.

13. Выберите лунку бланка, считайте абсорбцию других лунок (в течении 10 минут после этапа 12) при **450 нм**. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите длину волны на **630 нм**.

#### ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СКРИНИНГОВОГО ТЕСТА

1. Аббревиации.

N = средн. абсорбция отрицательных контролей

P = средн. абсорбция положительных контролей

S = абсорбция тестового образца

2. Вычисление значения cut-off

Пусть N менее 0,05. Пусть N равно или более 0,05 и N равно его действительному значению. Значение cut-off 2.1 раза N. Вычислите значение cut-off как указано в примере ниже:

N = 0,060 N = 0,036

Значение cut-off = 2,1x0,056 = 0,126

Значение cut-off = 2,1x0,05 = 0,105

3. Результат анализа

Тест положительный если S > cut-off значения

Тест отрицательный если S ≤ значения

Проверка действительности процедуры анализа:

Процедура анализа действительна только если N < 0.07 и P > 0.8.

#### Информация для заказа:

**ЧМП «ДИАМЕБ»**

**ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005**

**Тел.: (0342) 775122**

**Факс: (0342) 775612**

**E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)**

**[www.diameb.com](http://www.diameb.com)**