



**Набор ИФА
для качественного определения в
человеческой сыворотке или плазме
антител к оболочковому антигену
гепатита В (HBeAb)**

Кат. номер : E-HBE-1P
Количество : 96

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

Методика от 11-2005

НАЗНАЧЕНИЕ

1. Как метод диагноза вирусного гепатита.
2. для исследования гуморальной иммунной реакции на вирус гепатита В.
3. Для скрининга состояния анти-HBe перед вакцинацией.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Данный тест является ферментным иммуноанализом, основанный на принципе соревнования.

|__ анти-HBe--HBeAg __ анти-HBe
| (положительный образец)
|
|__ анти-HBe-HBeAg __ (анти-HBe)-HRP + субстрат

захваченный антиген
твердой фазы

ферменто-меченное
антитело

Полистирольные микротитрационные полосочные лунки покрыты анти-HBe для захвата HBeAg, который имеет в себе антиген твердой фазы (I-анти-HBe--HBeAg). Образец и конъюгат (мышиный моноклональный анти-HBe, меченный HRP) инкубируются в той же лунке в то же время. Если образец содержит анти-HBe, покрытый HBeAg будет частично блокирован, или блокирован целиком. Меченное антитело связывается только с незаблокированным антигеном твердой фазы. Инкубация с ферментом, гидропероксидом и TMB производят голубой окрас в микролунке, который становится желтым, когда реакция останавливается серной кислотой. Если образец содержит анти-HBe, только уменьшается насыщенность окраса сравнительно с образцами отрицательного контроля.

Представление

В наличии реагенты для 96 тестов (включая образцы и контроли).

КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

1. **Микроячейковые стрипы:** 1 планшет (96 тестов), 12 8-луночных полосок/планшет (делимые). Каждая ячейка планшета покрыта HBeAb и запечатана в алюминиевом мешке с силикагелевым пакетом как осушителем.
2. **Конъюгат:** 1 фл./6,2 мл (анти-HBe, меченное пероксидазой хрена).
3. **Положительный контроль:** 1 фл./1,0 мл.
4. **Отрицательный контроль:** 1 фл./1,0 мл.
5. **Промывочный раствор:** Концентрат (разбавить 1:25 перед использованием), 1 бут./40 мл.
6. **Хромоген А:** 1 фл./8 мл (содержащий гидро-пероксид).
7. **Хромогена В:** 1 фл./8 мл (содержащий TMB).
8. **Стоп раствор:** 1 фл./7 мл (2 M H₂SO₄).
9. **Планшетные накрыватели** : 2 шт.
10. **Инструкция пользователя:** 1 копия.

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Дистиллированная вода и обычный солевой раствор.
2. Ручные или автоматические пипетки на 10 мкл, 50 мкл, 1000 мкл и т.д..
3. Одноразовые насадки для пипеток.
4. Таймер.
5. Инкубатор (37⁰C).
6. Автоматический микропланшетный промыватель (также можно проводить вручную).

7. Микропланшетный ридер с фильтром 450 нм и 630 нм.
8. Абсорбирующая ткань.
9. Перчатки.
10. Микропланшетный миксер.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ по БЕЗОПАСНОСТИ

1. Обращайтесь с образцами сыворотки и плазмы как с потенциально инфекционными.
2. Полоски, покрытые HBeAb, конъюгат, анти-HBe положительный контроль могут переносить гепатит.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Если держать тестовые реагенты, в том числе полоски и положительные и отрицательные контроли при 2-8⁰C, они остаются стабильными до окончания срока годности, указанной на коробке. Алюминиевую сумку перед открытием нужно привести к температуре окружающей среды, чтобы предотвратить конденсацию на полосках. Неиспользованные полоски нужно разместить в пластмассовой сумке вместе с пакетом с силикагелем и хранить при 2-8⁰C. После использования части тестовых реагентов: TMB раствор, конъюгат, концентрированный промывочный раствор, контроли, и оставшееся содержимое набора стабильно до окончания срока годности, если хранить при 2-8⁰C в закрытых оригинальных флаконах. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течение 8 недель при 2-8⁰C.

ЗАБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. сыворотка или плазма должны быть свободными от микробиологического заражения при тестировании.
2. Консерванты (кроме азида) и повторное замораживание и размораживание могут дать ошибочные результаты.
3. Осадки, сгустки и клетки крови могут привести к ошибочно положительным результатам. Таким образом неразстворимый материал необходимо удалить из образцов путем центрифугирования перед тестированием.

ПРИМЕЧАНИЯ И ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

1. Не проводите тест в присутствии реактивных испарений (например, кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, поскольку это может повлиять на ферментную активность конъюгата.
2. Перед использованием убедитесь, что все образцы и контроли гомогенны.
3. Полоски использовать только 1 раз.
4. В одной процедуре не меняйте ELISA полоски, конъюгат и контроли реагенты разных партий и разных наборов.
5. Убедитесь, что микропланшет правильно накрыть во время этапов инкубации.
6. Все сосуды, используемые для приготовления раствора субстрата должны быть тщательно очищены и в конце промыты дистиллированной водой.
7. Во избежание загрязнения, не касайтесь верхнего края полосок пальцами.
8. Все этапы пипетирования должны исполняться с крайней осторожностью.
9. Во избежание загрязнения, не касайтесь краев лунок пипеткой при внесении конъюгата субстрата.
10. Проверьте наличие воздушных пузырей в лунках после всех этапов пипетирования. При их наличии, удалите, например, легким похлопыванием.
11. 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.
12. Не смешивайте компоненты разных наборов с разными номерами партий.

РЕКОМЕНДАЦИИ по ПРОМЫВКЕ

Недостаточная промывка отрицательно повлияет на результат теста. Следует тщательно соблюдать рабочие инструкции по эксплуатации промывочного оборудования. Полностью аспирируйте жидкость из всех лунок, наклоняя насадку аспирационной пипетки ко дну каждой лунки. Старайтесь не поцарапать внутренность лунки. После аспирации заполните лунки 0,3 мл разбавленного промывочного раствора. Аспирируйте жидкость по крайней мере через 5 сек. после заполнения. Проведите эти процедуры 5 раз. После конечной аспирации процедура промывки заканчивается высушиванием абсорбирующей тканью. При отсутствии автоматического промывателя, промывку можно делать вручную.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ

1. Разбавьте концентрированным промывочным раствором 1:25 дистиллированной водой. Разбавленный промывочный раствор должен иметь рабочую температуру 20-25°C.
2. Перед использованием дайте всем тестовым образцам, контролям, конъюгату, разбавленному промывочному раствору, субстрату и алюминиевому пакету, содержащему микропланшет и флакону с TMB достичь температуры окружающей среды

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Откройте алюминиевый пакет и извлеките планшет необходимым количеством полосок. Неиспользованные полоски следует рвануть в поставляемом полиэтиленовом пакете при наличии мешка с силикагелем (См. раздел **Хранение и Стабильность**). В процессе анализа полоски остаются в держателе. Полоски можно пометить от нижнего края.
2. В микропланшете оставьте **3 лунки** для отрицательного контроля (50 мкл каждая), **1 лунку** для положительного контроля (50 мкл) и **1 лунку** как бланк.
3. Внесите **50 мкл** каждого образца в оставшиеся ячейки.
4. Внесите **50 мкл** конъюгата в каждую лунку (кроме лунки бланка).
5. Накройте микропланшет накрывателем для планшета и инкубируйте **30 минут при 37°C**.
6. Промойте каждую лунку **5 раз** (см. процедуру промывки).
7. Внесите **50 мкл** хромогена А в каждую ячейку, включая **бланк**.
8. Внесите **50 мкл** хромогена В в каждую ячейку, включая **бланк**.
9. Хорошо перемешайте и накройте планшет новым накрывателем. Инкубируйте **15 минут при 37°C**.
10. Остановите реакцию путем внесения **50 мкл стоп раствора** в каждую ячейку (включая лунку бланка) и полностью перемешайте.
11. Считывание с микропланшета:
Выберите лунку бланка, считайте абсорбцию других лунок (в течение 10 минут после этапа 10) при **450 нм**. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите длину волны на **630 нм**.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СКРИНИНГОВОГО ТЕСТА**1. Аббревиации**

S = абсорбция тестового образца

N = средн. абсорбция отрицательных контролей

P = средн. абсорбция положительных контролей

Вычислите абсорбцию для каждого образца и контроля путем вычитания бланка от каждого образца и значения контроля. Если исправление бланка выполняется автоматически микропланшетным считывателем, пропустите этот этап.

2. Вычисление cut-off значения

Значение cut-off = $0,5x(N+P)$

3. Результат анализа

Образец положительный если S меньше cut-off значения.

Образец отрицательный если S больше/равно cut-off значению.

Проверка действительности процедуры анализа:

Процедура анализа действительна только если $P < 0.07$ и $N > 1.00$.

Интерпретация результатов скринингового теста

Отрицательный результат означает, что проверенный образец или не содержит никаких anti-HBe, или содержит anti-HBe ниже предела обнаружения иммуноанализом. Это случается, когда никакая инфекция гепатита В не обнаружена, в течение периода инкубации или после полного восстановления от давней инфекции с потерей обнаруживаемых антител к HBe. Положительный результат означает, что образец содержит антитело к HBeAg и указывает, что пациент был заражен вирусом гепатита В когда-нибудь раньше.

Как и с другим иммуноанализами, могут происходить случайные ошибочно положительные реакции, которые в большинстве случаев не повторяются. Поэтому рекомендуется повторно проверить все образцы, предоставляющие изначально положительный результат. Чтобы получить больше информации по поводу состояния гепатита В пациента, требуются дополнительные тесты на маркеры гепатита В. Пациенты, положительные к обоим anti-HBe и anti-HBs имеют необходимый гуморальный иммунитет для защиты против повторной инфекции. Однако, необходимо соблюдать международные и /или национальные инструкции по скринингу перед вакцинацией,

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua