



## Набор ИФА для определения антител к вирусу гепатита D (HDV) в человеческой сыворотке или плазме

Каталог. № : KHD8EW  
К-во анализов : 96  
Производитель : Radim (Италия)

Методика от 06-2006

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

### ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТОЛЬКО В ДИАГНОСТИКЕ IN VITRO

#### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Антитела анти-HDV, если присутствуют в образце, конкурируют с определенным для вируса поликлональным IgG, маркированным пероксидазой (HRP), за фиксированное количество рекомбинанта HDV, нанесенного на микропланшет.

Исследование проводится с использованием двухэтапной инкубационной конкурентоспособной системой. Сначала образец добавляется в планшет, и определенные анти-HDV антитела связываются с адсорбированным антигеном. После промывки добавляется конъюгированное ферментом поликлональное антитело к HDV и связывается со свободной частью нанесенного антигена.

После промывки распределяется смесь хромогена/субстрата. Концентрация связанного фермента в твердой фазе становится обратно пропорциональной сумме анти-HDV антител в образце, и его активность обнаруживается добавлением хромогена/субстрата.

Концентрация HDV-определенных антител в образце определена посредством порогового значения, позволяющего проводить полуколичественное обнаружение анти-HDV антител.

#### КОМПОНЕНТЫ

- Микропланшет:** 1 планшет, 8x12 микролуночных полосок, покрытых рекомбинантным HDV-определенным антигеном и запечатанных в мешочек с осушителем. Перед вскрытием позвольте микропланшету достичь комнатной температуры; снова запечатайте неиспользованные полоски в мешок с осушителем и храните при 2-8°C.
- Отрицательный контроль:** 1x2,0 мл/фл. Готовый к использованию контроль. Содержит протеины козьей сыворотки, 100 mM буфера Tris-HCl pH 7.4+/-0.1, 0.09% азида Na и 0.1% катона GC в качестве консервантов. Код цвета отрицательного контроля – бледно-желтый.
- Положительный контроль:** 1x2,0 мл/фл. Готовый к использованию контроль. Содержит протеины козьей сыворотки, анти-HDV антитела высоких титров, 100 mM буфера Tris-HCl pH 7.4+/-0.1, 0.09% азида Na и 0.1% катона GC в качестве консервантов. Код цвета положительного контроля – зеленый.
- Калибратор:** 2 фл. Лиофилизированный калибратор. Подлежит растворению указанным на этикетке объемом дистиллированной воды. Содержит протеины бычьей сыворотки, человеческие антитела к HDV низких титров, 0.2 мг/мл сульфата гентамицина и 0.1% катона GC в качестве консервантов.  
**Замечание:** объем, необходимый для растворения содержимого флакона может отличаться в зависимости от партии. Пожалуйста, используйте правильный объем, указанный на этикетке.
- Концентрат промывочного буфера:** 1x50 мл/бут. Концентрированный раствор 20x. После разбавления промывочный раствор содержит 10 mM фосфатного буфера pH 7.0+/-0.2, 0.05%, Tween 20 и 0.1% катона GC.
- Ферментный конъюгат:** 1x16 мл/фл. Готовый к использованию реагент. Содержит конъюгированные пероксидазой хрена поликлональное антитело к HDV в присутствии 0,2 мг/мл гентамицина сульфата и 0.1% катона

GC в качестве консервантов. Код цвета компонента – красный.

- Хромоген/субстрат:** 1x16 мл/фл. Готовый к использованию компонент. Содержит 50 mM раствор цитрат фосфатного буфера pH 3,5-3,8, 4% диметилсульфоксида, 0,03% TMB и 0,02 перекиси водорода.  
**Примечание:** защищать от света по причине чувствительности к сильному свету.
- Серная кислота:** 1x16 мл/фл. Содержит 0,3 M раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. **Внимание:** раздражитель.
- Пленки для накрывания планшета:** 2 шт.
- Инструкция пользователя:** 1 шт.

#### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

- Откалиброванные микропипетки в диапазоне от 10-1000 мкл со сменными пластмассовыми наконечниками.
- Подготовленная вода (бидистиллированная или деионизированная и др.).
- Таймер с 60-минутным диапазоном или более.
- Промокательная бумага.
- Откалиброванный термостатический инкубатор микропланшетов ИФА на 37°C.
- Откалиброванный микролуночный считыватель для ИФА с диапазоном считывания 450 нм, и также с возможностью установки фильтров (бланков) на 620-630 нм.
- Откалиброванное промывочное устройство для ИФА.
- Вихревые или аналогичные смесители.

#### Автоматический анализ

- Данный анализ может проводиться на планшете при использовании автоматического аппарата для наборов ELISA.
- Производитель гарантирует соответствующее использование набора на автоматических аппаратах производства Radim и/или SEAC.
- При использовании других автоматических микропланшетных аппаратов конечный пользователь несет ответственность за правильность анализов наборов ELISA.

#### ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Не смешивайте специфичные реагенты из различных партий.
- Возможно смешивание общих реагентов из разных партий.
- Не использовать реагенты после истечения их сроков годности.
- Не храните и не оставляйте реагенты и образцы на высокой температуре или на территории возможного загрязнения.
- Используйте тщательно очищенную лабораторную посуду, не содержащую загрязнения ионами металла или окисляющих веществ.
- Используйте дистиллированную или деионизированную воду, хранящуюся в крайне чистых емкостях.
- Осторожно избегайте любого загрязнения между образцами; с этой целью для каждого образца и реагента следует использовать одноразовые наконечники.
- Ни в какой способ не изменяйте «Процедуру анализа». Если вы не следуйте:
  - точным периодам инкубации и количествам добавляемых реагентов;
  - периодам инкубации и температуре,это может вызвать неправильные клинические результаты.
- Разбавьте лиофилизированные реагенты, если таковы есть, как описано на соответствующих этикетках. Любое отклонение в использовании реагента или неправильных объемов может повлиять на надежность полученных результатов.
- При ручной процедуре важно использовать откалиброванные пипетки и иметь соответствующие технические руководства по применению. На первый план важности выступает хорошая точность в приготовлении и распределении реагентов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии, правильно откалибровано и проходить регулярное техобслуживание.
- Убедитесь, что аспирационный насос или автоматизированное устройство для промывки лунок в отличном рабочем состоянии. Нелостаточная промывка лунок может привести к неправильным классификациям образцов. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.
- Убедитесь, что микропланшетный спектрофотометр в отличном рабочем состоянии. Использование неоткалиброванного спектрофотометра или грязных фильтров может привести к неправильному считыванию образцов с последующей

неправильной их классификацией. Убедитесь, что все используемое оборудование в отличном рабочем состоянии.

- Убедитесь, что инкубационная камера (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Температура инкубации, не соответствующая  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  может привести к потерям чувствительности и/или биологической денатурации (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Убедитесь, что микропланшетный встряхиватель (если требуется) в отличном рабочем состоянии. Неправильное встряхивание может причинить неправильные классификации образцов.
- Убедитесь, что все используемое для хранения образцов оборудование в отличном рабочем состоянии. Хранение при температуре, отличающейся от рекомендуемой может ричинить денатурацию биологических материалов (образцов и/или реагентов). Убедитесь, что используемое оборудование в отличном рабочем состоянии и периодически проверяйте фиксируемую температуру.
- Используйте соответствующий метод для правильной идентификации образцов пациентов. Неправильная идентификация может привести к потерям специфичности системы и неправильным клиническим результатам.
- При работе с потенциально инфекционными материалами и во время проведения анализа надевайте одноразовые перчатки.
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте, не курите и не пользуйтесь косметикой в процессе анализа.
- Хромоген и блокирующий реагент должны использоваться с осторожностью. Избегайте контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками. При несчастном случае тщательно промойте проточной водой.
- Все материалы человеческого происхождения. Использованные для подготовки этого набора были протестированы и дали отрицательный результат к HBsAg, анти-ВИЧ и анти-HCV. Поскольку ни один из существующих методов не гарантирует полного отсутствия этих вирусов, все образцы и реагенты, которые содержат используемые для анализа биологические материалы, должны считаться потенциально инфекционными.
- Избегайте разбрызгивания и образования аэрозолей. При их возникновении тщательным образом промойте 3% раствором гипохлорида натрия. Любой очищающий материал такого состава следует считать потенциально инфекционным и придерживаться требований по его утилизации.
- Некоторые компоненты набора содержат азид натрия в качестве консерванта. Во избежание накопления взрывоопасных азидов металла в медных и свинцовых трубопроводах реагенты необходимо удалять путем промывания водосточной трубы большим количеством воды.

#### ОБРАЗЦЫ: ПОДГОТОВКА И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сбор крови проводится асептически венепункцией и плазма или сыворотка подготавливаются с использованием стандартных методик подготовки образцов для клинического лабораторного анализа. Не наблюдалось никакого влияния при подготовке образца с цитратом, EDTA и гепарином.
2. Избегайте любого добавления консервантов к образцам, особенно азида натрия, так как этот химический продукт повлиял бы на ферментативное действие конъюгата, приводя к отрицательным результатам.
3. Выборки должны быть четко идентифицированы по кодами или названиями, чтобы избежать неверной интерпретации результатов. При использовании набора для скрининга единиц крови, настоятельно рекомендуется использовать метку штрих-кода.
4. Гемолизированные (красные) и явно гиперлипемические ("молочные") образцы должны быть удалены, так как они могут производить ошибочные результаты. Образцы, содержащие остатки фибрина или тяжелые частицы или же нитчатые формы бактерий и тел, должны быть удалены, поскольку они могут вызывать ошибочные результаты.
5. Сыворотки и плазмы могут храниться при  $+2-8^\circ\text{C}$  до пяти дней после сбора. Для более длительного хранения образцы могут быть заморожены до  $-20^\circ\text{C}$  в течение нескольких месяцев. Любые замороженные образцы не должны замораживаться/размораживаться более чем один раз, поскольку это может производить частицы, влияющие на результат анализа.
6. При наличии частиц, центрифугируйте при 2.000 об/мин в течение 20 минут или профильтруйте, используя 0.2-0.8 мкм фильтры для очистки образца для анализа.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Анализ должен быть выполнен согласно тому, что выложено ниже, придерживаясь одного инкубационного времени для всех образцов в анализе.

1. Разместите требуемое количество микролунок в штативе. Оставьте лунку A1 пустой для операции бланкирования. Храните другие полоски запечатанными в мешочке с осушителем при  $+2-8^\circ\text{C}$ .
  2. Пипетируйте в соответствующие лунки 100 мкл отрицательного контроля в трех экземплярах, 100 мкл калибратора в двойном экземпляре и 100 мкл положительного контроля в одном экземпляре, и затем 100 мкл образцов. Проследите. Чтобы контроли/калибратор и образцы были внесены правильно. После этого инкубируйте микропланшет в течение **60 минут при  $+37^\circ\text{C}$** .
  3. Промойте микропланшет автоматическим 4-5 раз 350 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора.
  4. Во все лунки, кроме A1. пипетируйте 100 мкл ферментного конъюгата. Убедитесь, что реагент был правильно добавлен. После этого инкубируйте микропланшет в течение **60 минут при  $+37^\circ\text{C}$** .
- Важное замечание:** Во время распределения ферментного конъюгата будьте осторожны, чтобы не коснуться наконечником внутренней пластмассовой поверхности лунки. Может произойти загрязнение.
5. Промойте микропланшет как описано выше.
  6. Пипетируйте 100 мкл смеси ТМВ/Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в каждую лунку, включая лунку бланка. Убедитесь, что реагент был правильно добавлен. Затем инкубируйте микропланшет при **комнатной температуре в течении 20 минут**.
- Важное замечание:** Не подвергайте влиянию сильного прямого света, поскольку может образоваться высокий фон.
7. Для остановки ферментативной реакции раскапайте 100 мкл серной кислоты во все лунки, следуя той же самой последовательности пипетирования как и в п. 6, чтобы остановить реакцию. Добавление стоп раствора превратит отрицательный контроль и отрицательные образцы из синего цвета в желтый.
  8. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке при 450 нм фильтра считывания и, если возможно, при 620-630 нм (фоновая субтракция), проведя слепой тест аппаратом на лунке A1.

#### Важные замечания:

1. Если второго фильтра нет в наличии, убедитесь перед считыванием, что никаких следов пальцев на дне микролунки нет.
2. Считывание должно быть выполнено только после добавления стоп раствора, и в любом случае не позднее чем через 20 минут после его добавления. Иногда может происходить самоокисление хромогена, приводя к высокому фону.

Используя в процедуре автоматический микропланшетный аппарат производства Radim и/или SEAC, ссылайтесь на соответствующее руководство пользователя. При использовании вышеуказанного оборудования, спектрофотометрическое считывание будет проводиться автоматически при 3 различных длинах волны: 450, 405 и 620 нм, таким образом, позволяя расширить диапазон кривой.

Метод	Действия
Контроли/калибратор	100 мкл
Образцы	100 мкл
<b>1-я инкубация</b>	<b>60 мин.</b>
Температура	$+37^\circ\text{C}$
Промывка	4-5 раз 350 мкл/лунку
Ферментный конъюгат	100 мкл
<b>2-я инкубация</b>	<b>60 мин.</b>
Температура	$+37^\circ\text{C}$
Промывка	4-5 раз 350 мкл/лунку
Смесь ТМВ/Н <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 мкл
<b>3-я инкубация</b>	<b>20 мин.</b>
Температура	КТ
Серная кислота	100 мкл
ОП считывания	450 нм и 620-630 нм

Пример схемы распределения приведен в таблице ниже:

## МИКРОПЛАНШЕТ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	BLK	S2										
<b>B</b>	NC	S3										
<b>C</b>	NC	S4										
<b>D</b>	NC	S5										
<b>E</b>	CAL	S6										
<b>F</b>	CAL	S7										
<b>G</b>	PC	S8										
<b>H</b>	S1	S9										

Сокращения: BLK = бланк NC = отрицательный контроль  
CAL = калибратор PC = положительный контроль S = образец

## ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверка проводится с использованием контролей и калибратора при каждом использовании набора, чтобы проверить соответствие значений их ОП 450 нм ожидаемым значениям, указанным в таблице ниже:

Проверка	Требования
Лунка бланка	< 0.100 ОП при 450 нм
Отрицательный контроль (NC)	> 1.000 ОП при 450 нм после слепого теста При более низкой, тщательно контролируйте процедуру промывки и уменьшите количество промывок или время намокания Коэффициент вариации < 30%
Калибратор	NC/10 < ОП при 450 нм < NC/5
Положительный контроль	ОП при 450 нм < NC/10

Если результаты анализа соответствуют требованиям, указанным выше, переходите к следующему этапу. Если нет, дальше не продолжайте и сделайте следующее:

Проблема	Проверка
<b>Лунка бланка</b> > 0.100 ОП при 450 нм	1. Раствор хромогена/субстрата не был загрязнен во время анализа
<b>Отрицательный контроль (NC)</b> < 1.000 ОП при 450 нм после слепого теста  Коэффициент вариации > 30%	1. Процедура промывки и настройки устройства для промывки соответствуют данным проверки перед исследованием; 2. Был использован правильный промывочный раствор и промывочное устройство было проверено перед его использованием; 3. Не было допущено ошибки в процедуре анализа (распределения положительного контроля вместо отрицательного); 4. Не произошло загрязнения отрицательного контроля или его лунок, поскольку образцы положительные, нет разливания, ферментный конъюгат в норме; 5. Микропипетки не были загрязнены положительными образцами или ферментным конъюгатом; 6. Промывочные голки не заблокированы или частично засорены.
<b>Калибратор</b> ОП при 450 нм вне диапазона	1. Процедура была проведена правильно; 2. Не было ошибок в распределении (напр.: в распределении отрицательного контроля вместо калибратора); 3. Процедура промывки и настройки промывочного устройства были проверены перед его использованием; 4. Не произошло внешнего загрязнения калибратора.

<b>Положительный контроль</b> ОП при 450 нм > NC/10	1. Процедура была проведена правильно; 2. Не было ошибок в распределении контролей (напр.: в распределении отрицательного контроля вместо положительного); В этом случае отрицательный контроль будет иметь значение ОП 450 нм > 0.150. 3. Процедура промывки и настройки промывочного устройства были проверены перед его использованием; 4. Не произошло внешнего загрязнения положительного контроля.
--	---

При возникновении этих проблем после проверки, сообщите о проблеме вышестоящему лицу для предприятия дальнейших действий.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа рассчитываются посредством порогового значения, которое определяется следующей формулой:

$$\text{Пороговое значение (cut-off)} = (\text{NC} + \text{PC}) / 5$$

**Важное замечание:** При вычислении результатов оперативной системой автоматической станции ИФА? убедитесь в использовании правильной формулы для вычисления порогового значения и проведите правильную интерпретацию результатов.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты интерпретируются как соотношение порогового значения и ОП образца при 450 нм или Co/S. Результаты интерпретируются согласно следующей таблице:

Co/S	Интерпретация
< 0.9	Отрицательный
0.9 - 1.1	Сомнительный
> 1.1	Положительный

Отрицательный результат указывает, что пациент не был инфицирован HDV.

Любой пациент, демонстрирующий сомнительный результат должен быть проверен на втором образце через 1-2 недели после сбора первого образца.

Положительный результат указывает на HDV инфекцию, и поэтому пациент должен пройти соответствующее лечение.

## Важные примечания:

- Интерпретация результатов должна проводиться под наблюдением сотрудника лаборатории, чтобы уменьшить риск ошибок и неверных интерпретаций.
- Когда испытательные результаты передаются из лаборатории в другое заведение, внимание должно быть обращено, чтобы избежать ошибочной передачи данных.
- Диагноз вирусной инфекции гепатита должен быть поставлен пациенту компетентным врачом.

Пример вычисления приведен ниже:

Последующие данные не должны использоваться как замена или как действительные цифры, полученные пользователем.

Отрицательный контроль: 2.100 – 2.200 – 2.000 ОП при 450 нм  
Среднее значение: 2.100 ОП при 450 нм  
Выше чем 1.000 – приемлемо

Положительный контроль: 0.100 ОП при 450 нм  
Ниже чем NC/10 1.000 – приемлемо

$$\text{Пороговое значение} = 0.020 + 0.350 = 0.370$$

Калибратор: 0.300 - 0.260 ОП при 450 нм  
Среднее значение: 0.280 ОП при 450 нм  
В пределах диапазона NC/10 < ОП при 450 нм < NC/5 – приемлемо  
Образец 1: 0.020 ОП при 450 нм  
Образец 2: 1.900 ОП при 450 нм  
Образец 1 Co/S > 1.1 положительный  
Образец 2 Co/S < 0.9 отрицательный

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Оценка рабочей характеристики проводилась в соответствии с IVD Директивой 98/79/ЕС.

**1. Предел обнаружения**

При отсутствии международного стандарта, чувствительность анализа была вычислена посредством продукта под названием имени Assigun n°127, поставляемого компанией Boston Biomedica Inc. – США.

В таблица ниже зафиксировано ОП при 450 нм при подготовке разбавления эмбриональной сыворотке теленка, чтобы вывести ограничивающую кривую разбавления. Использовались 3 различные партии.

Assigun # 127	KHD8EW Партия# 1102		KHD8EW Партия# 0103		KHD8EW Партия# 0403	
	ОП при 450	Co/S значение	ОП при 450	Co/S значение	ОП при 450	Co/S значение
1x	0.171	3.0	0.163	2.9	0.156	2.8
2x	0.187	2.7	0.176	2.6	0.179	2.5
4x	0.230	2.2	0.220	2.1	0.202	2.2
8x	0.298	1.7	0.285	1.6	0.271	1.6
16x	0.417	1.2	0.405	1.1	0.402	1.1
32x	0.514	1.0	0.490	0.9	0.482	0.9
64x	0.717	0.7	0.700	0.7	0.705	0.6
128x	1.063	0.5	1.006	0.5	1.015	0.4
CTRL (-)	2.484	////////	2.261	////////	2.114	////////

**2. Клиническая специфичность и чувствительность**

Клиническая эффективность была оценена в клиническом исследовании, проводимом Отделением гастроэнтерологии в Италия, на больше чем 400 образцах в сравнении с референтным набором.

Отрицательные, положительные и потенциально влияющие образцы были исследованы в испытании.

И плазма, полученная различными стандартными методами подготовки (цитратная, ЭДТА и гепариновая), и сыворотки, использовались для определения специфичности. Никакой ошибочной реактивности из-за метода подготовки препарата не наблюдалась.

Чувствительность	> 98 %
Специфичность	> 98 %

**3. Точность**

(Данные исследований точности см в оригинале инструкции на стр. 28).

**ОГРАНИЧЕНИЯ**

Бактериальное загрязнение или тепловая инактивация препарата могут повредить значения спектральной поглощательной способности образцов с последовательным изменением уровня аналита.

Этот тест является подходящим только для анализа единичных образцов, а не объединенных.

Диагноз инфекционной болезни не должен быть установлен на основании результата единственного исследования. Необходимо принимать во внимание историю болезни пациента, семиологию, а также другие диагностические данные.

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
Тел.: (0342) 775122  
Факс: (0342) 775612  
E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

