

МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

- 1. Микролуночный планшет**
Пустые микролуночные полоски, зафиксированные в белом держателе полосок. Планшет запечатан в пакете из фольги с осушителем.
8x12-луночных полосок на планшет. Каждая лунка содержит моноклональные антитела, реактивные к HbsAg. Микролуночные полоски могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8 °С.
- 2. Отрицательный контроль**
Желтоватая жидкость во флаконе с зеленой крышкой.
1 мл во флаконе.
Протеин-стабилизирующий буфер, не активный к анти-НВs.
Консерванты: 0,1% Проклин 300
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- 3. Положительный контроль**
Красная жидкость в флаконе с красной крышкой.
1 мл во флаконе
Анти-НВs, разбавленный в протеиностабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % Проклин 300
Готов к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- 4. HRP-конъюгат реагент**
Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой
7 мл во флаконе
Анти-НВsAb антитела, конъюгированные пероксидазой хрена
Готов к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- 5. Промывочный буфер**
Бесцветная жидкость в бутылке с белой крышкой
30 мл в бутылке
РН 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 одну неделю при комнатной температуре или две недели при 2-8 °С.
- 6. Раствор хромогена А**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой
8 мл во флаконе
Раствор перекиси мочевины
Готов к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- 7. Раствор хромогена В**
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой
8 мл во флаконе
ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте
Готов к использованию. После вскрытия стабилен месяц при 2-8 °С.
- 8. Стоп раствор**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой.
8 мл в флаконе
Разбавленная серная кислота (2.0 M H₂SO₄)
- 9. Полиэтиленовый запечатывающийся пакет**
Для неиспользуемых полосок
- 10. Картон для накрытия планшета**
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- 11. Инструкция**

Требуемые, но не поставляемые материалы

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 °С.
8. Микршейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
10. Микропланшетная система для аспирации / промывания.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- 1. Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) по крайней мере на протяжении 15-30 мин. Проверьте концентрат промывочного буфера на наличие в нем 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.

- 2. Число лунок:** Поместите необходимые полоски в держатель, что включают лунки для трех отрицательных контролей (например, **B1, C1, D1**), двух положительных (напр., **E1, F1**) и одного бланка (например, **A1**, в эту лунку не добавляются ни образцы, ни HRP-конъюгат). Если результаты будут определяться при использовании двойной длины волны, использование бланка можно пропустить. Используйте только необходимое число полосок.
- 3. Добавление образца и HRP-конъюгата:** Добавьте **50 мкл** положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие лунки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Добавьте **50 мкл HRP-конъюгата** в каждую лунку кроме бланка и смешайте легким постукиванием по планшету.
- 4. 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.
- 5. Промывание:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** разбавленным моющим буфером. Каждый раз выдержите лунки 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
- 6. Обозначение окраса:** 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.** Энзимная реакция между хромогеном и HRP-конъюгатом вырабатывает синий окрас в положительном контроле и НВsAb положительном образце.
- 7. 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-НВs положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
- 8. Измерение абсорбции:** Калибруйте планшетный считыватель 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Каждый планшет должен рассматриваться отдельно при подсчете и интерпретации результатов независимо от количества анализируемых 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 порогового значения (Cut-off/CO)

Значение CO = *Nc+2,1

*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже **0,05**, принимайте ее как **0,05**. Если выше **0,05**, смотрите диапазон контроля качества.

Пример:

1. Вычисление Nc:			
№ лунки	B1	C1	D1
ОП отрицательных контролей	0,02	0,012	0,016
Nc = 0,016 (значение Nc ниже 0,05, поэтому его следует принимать как 0,05)			
2. Вычисление порогового значения (CO) = 0,05 x 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

Тестовые результаты достоверны, если выполнены критерии контроля качества. Рекомендуется, что в каждой лаборатории установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

1. Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор меньше 0,080 при 450 нм.
2. Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фоновое определения (бланка).
3. Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фоновое определения.

3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция (ОП) каждого образца).

Отрицательные результаты (S/CO<1): образцы, что дали абсорбцию ниже величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие поверхностного антигена к гепатиту В. Поэтому, пациенты возможно не инфицированы вирусом гепатита В.

Положительные результаты (S/CO≥1): образцы дали абсорбцию выше или равную пороговой величине, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие поверхностного антигена к гепатиту В. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные к анти-НВs и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В. Повышенные концентрации анти-НВs указывают на выздоровление и иммунитет к НВV.

Граничные значения (S/CO = 0,9-1,00): Образцы с абсорбцией к пороговому значению между 0,9 и 1,00 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторный анализ дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные к НВsAb.

РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клиническая специфичность: клиническая специфичность была определена на панели образцов. Полученных от 2500 здоровых доноров крови и 300 не диагностированных госпитализированных пациентов. Повторно реактивные образцы и образцы при подтверждении положительности установленным тестом не включены в вычисление специфичности.

	Образец	+	-	Подтвержд. положит.	Специфичность	Ложно положит.
Доноры крови	2500	56	2447	53	99,87%	3
Госпит. пациенты	300	27	274	26	99,63%	1

Клиническая чувствительность: клиническая чувствительность этого набора была вычислена на группе образцов полученных от 670 пациентов с гепатитом В с четко характеризированной клинической историей, что основывается на анализах для определения HbsAg, HbeAg, анти-НВs, анти-НВe и анти-НВс. Лицензированный HbsAg тест использовался как подтверждение анализа. Оценка результатов дана ниже. Результаты, полученные в индивидуальной лаборатории, могут отличаться.

Чувствительность	Образец	-	+
Острый	200	0	200
Хронический	400	0	399
Восстановление	70	65	5
	Подтвержд. положит.	Чувствительность	Ложно положит.
Острый	200	100%	0
Хронический	400	99,75%	1
Восстановление	5	100%	0

Аналитическая специфичность

1. Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HIV, HCV, CMV и TP.
2. Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.
3. Не наблюдались побочных эффектов до концентрации к HbsAg 200 000 нг/мл при клинических тестированиях.
4. Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Аналитическая чувствительность конечной точки (нижний предел определения): Анализ демонстрирует чувствительность при СО 0,5 нг/мл (adr) и 0,5 нг/мл (adw, ay).

Воспроизводимость		Внутри анализа		Между анализами	
Тип образца	№	Средн. ОП	КВ %	Средн. ОП	КВ %
0,5нг/мл НВsAg	10	0,175	10,6	0,150	11,0
Слабо положительный	10	0,457	9,0	0,432	9,5
Умеренно положительный	10	1,572	7,0	1,437	7,5
Сильно положительный	10	2,327	4,2	2,302	4,4
Положительный контроль	10	2,322	4,1	2,315	4,2

ОГРАНИЧЕНИЯ

1. Не проявляющиеся во второй раз положительные результаты могут появляться через основные биологические свойства ИФА. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности. Однако в редких случаях некоторые НВV мутанты или подтипы могут оставаться неопределяемыми. Антигены могут быть неопределяемые во время ранней стадии заболевания и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.
2. Если после повторного анализа первично реактивных образцов получается отрицательный результат, эти образцы должны считаться ошибочно положительными и интерпретироваться как отрицательные. Как и в других очень чувствительных ИФА ошибочно положительные результаты могут появляться по нескольким причинам, большинство из которых относятся, но не ограничиваются, несоответствию этим этапом промывки.
3. Любые положительные результаты должны интерпретироваться в сочетании с клинической информацией пациента и другими результатами лабораторных анализов.
4. Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
5. Преобладание маркера влияет на величины анализа.
6. Набор предназначен ТОЛЬКО для анализа отдельных образцов сыворотки или плазмы. Не используйте его для анализа тропных образцов, слюны, мочи или другой жидкость организма или смешанной крови.
7. Это качественный анализ и результаты не могут использоваться для измерения концентрации антигенов.

УКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ ЗАГРЯЗНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

1. Величины положительного или отрицательного контроля, что находятся за диапазоном контроля качества, указывают на возможное загрязнение реагентов и/или ошибку оператора или оборудования. В этом случае, результаты должны приниматься как неверные и образцы следует повторно тестировать. В случае постоянных неверных результатов, что классифицируются через загрязнение или нестабильности реагентов, немедленно замените реагенты новыми.
2. Если, после смешивания хромогена А и В в ячейке, цвет изменится на желтый через несколько минут, не продолжайте проведение анализа и замените реагенты новыми.

ГОДНОСТЬ

Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке набора и этикетках реагентов.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛИСТАМИ

ИФА 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. ВНИМАНИЕ – ВАЖНЫЙ ЭТАП: Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8°C.
4. Используйте только необходимый объем образца, как указано в инструкции. В противном случае, это может повлиять на чувствительность результата.
5. Не касайтесь дна и поверхности лунок; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания лунок 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 лунок.
9. Калибрируйте 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 37⁰С.
12. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну лунок.
13. При измерении планшетным ридером, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
14. Все образцы из человеческой крови должны рассматриваться как потенциально инфекционные.
15. в наборе могут использоваться материалы человеческого происхождения. Эти материалы подлежали тестированию с помощью соответствующих наборов с приемлемой работоспособностью и оказались отрицательными к антителам к ВИЧ 1/2, вируса гепатита С, ТР, и поверхностному антигену гепатита В. Однако, не существует аналитического метода, дающего полную гарантию на полное отсутствие инфекционных агентов в образцах или реагентах. Поэтому, с реагентами и образцами следует обращаться с крайней осторожностью, как будто они могут передавать инфекционные болезни. Строгое следование требованиям хорошей лабораторной практики может гарантировать собственную безопасность.
16. Бычья сыворотка может использоваться в этом наборе. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) и фетальная сыворотка теленка (FCS) взятые географических районов, где нет BSE/TSE.
17. Наконечники пипеток, флаконы, полоски и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при 121⁰С или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
18. 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 раздражении кожи.
19. На Ферментную 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.
20. Спецификация данных по безопасности материалов доступны по заказу.
21. При использовании полностью автоматической микропланшетной системы, во время инкубации не накрывайте планшет. Постукивание остатков после промывания также можно пропустить.



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул.Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
е-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com