



Набор ИФА для определения поверхностного антигена гепатита В

Кат. номер : 1701-12
Количество : 96
Производитель : DAI (США)

Методика 23-04-2009

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

Анализ	HBsAg ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный – положительный и отрицательный контроль
Образец	50 мкл
Специфичность	97,70 %
Чувствительность	100 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12-14 мес.

НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуоферментным набором для качественного определения HBsAg в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для исследования доноров крови и для диагностики пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Вирус гепатита В является оболочковым двухцепным ДНК вирусом, что принадлежит к семейству *Hepadnaviridae* и используется как основная причина передающегося по крови гепатита вместе с вирусом гепатита С. При инфекции HBV вырабатывается целый спектр клинических симптомов от мягкой не проявляющейся болезни до скоротечного гепатита, некоторых хронических заболеваний печени, что могут привести к циррозу и карциноме печени. Классификация инфекции гепатита В требует идентификации нескольких серологических маркеров, выраженных во время трех фаз (инкубации, острой и фазы выздоровления) инфекции. Сейчас несколько диагностических тестов используется для скрининга, клинической диагностики и управления болезнью.

Поверхностный антиген гепатита В или HbsAg, предварительно описанный как австралийский антиген, является наиболее важным протеином развивающегося вируса гепатита В. Поверхностный антиген содержит детерминанту «а», широко известную как вирусный субтип и иммунологически установленный в двух отдельных субгруппах (ay и ad). HBV имеет 10 серотипов и четыре HbsAg субтипов (adw, ady, ayw, ayg). HbsAg может определяться 2-4 неделями перед тем как ALT уровни станут патологическими и 3-5 неделями перед развитием симптомов. Серологическое определение HbsAg является веским методом для диагноза и предотвращения HBV инфекции и ELISA использует аналитическую систему для скрининга доноров крови и клинического диагноза HBV в инфицированных индивидов.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Полистироловые микролуночки предварительно покрыты моноклональными антителами, специфическими к HBsAg. Образцы сыворотки или плазмы добавляются в микролуночки вместе с вторым антителом, конъюгированным пероксидазой хрена (HRP) и направлены против эпитопа HbsAg. Во время инкубации специфический иммуокомплекс при присутствии в образце HbsAg, привязывается к твердой фазе. После промывания для удаления протеинов образцов сыворотки и несвязанный HRP-конъюгат, добавляется в луночки раствор хромогена, содержащий TMB и перекись мочевины. При присутствии антитело-антиген-антитело(HRP) «сэндвич» иммуокомплекса, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP-конъюгата в голубой окрас. Голубой окрас изменяется на желтый после остановки реакции с серной кислотой. Количество цвета можно измерить и он пропорционален количеству антигена в образце. Луночки, содержащие образцы отрицательные к HbsAg остаются бесцветными.

СХЕМА принципа анализа: Сэндвич ИФА двойного антитела (См. в оригинале инструкции).

КОМПОНЕНТЫ

■ **МИКРОЛУНОЧНЫЙ ПЛАНШЕТ** 1 шт.
Микролуночные полоски, зафиксированные в белом держателе полосок. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.
12 8-луночных полосок на планшет.
Каждая луночка содержит моноклональные антитела, реактивные к HbsAg

(анти-HBs). Микролуночные полоски могут использоваться отдельно.
Поместите неиспользованные луночки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.

- **Отрицательный контроль, 1 фл.**
Желтоватая жидкость в флаконе с зеленой крышкой 1 мл в флаконе
Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к HBsAg.
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 1 мл в флаконе
HBsAg, 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 7 мл в флаконе
анти-HBsAg антитела, конъюгированные пероксидазой хрена
Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8°C.
- **Промывочный буфер, 1 бут.**
Разбавить перед использованием
Бесцветная жидкость в бутылке с белой крышкой 30 мл в бутылке PH 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)
Концентрат необходимо разбавить 1:20 дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабилен 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 8 мл в флаконе
Раствор перекиси мочевины
Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8°C.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой 8 мл в флаконе
TMB раствор, TMB растворенный в лимонной кислоте
Готовый к использованию. После вскрытия стабилен месяц при 2-8°C.
- **Стоп раствор, 1 фл.**
Бесцветная жидкость в белом флаконе с белой крышкой. 8 мл в флаконе
Разбавленная серная кислота (0,2 M H₂SO₄)
- **Полиэтиленовый запечатывающийся пакет, 1 шт.**
Для неиспользуемых полосок
- **Картон для накрытия планшета, 1 лист**
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- **Инструкция, 1 шт.**

ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И АППАРАТЫ

- Свежая дистиллированная или деионизированная вода
- Одноразовые перчатки и часы
- Контейнер для отходов.
- Сменный лоток V-формы.
- Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
- Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
- Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5°C.
- Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
- Микропланшетный ридер, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
- Микропланшетная система для аспирации / промывания.

СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранной венопункцией, должна стечь естественным путем. Необходимо проследить, что образцы сыворотки не содержали микроорганизмов. Любые видимые частицы в образце необходимо удалить центрифугированием при 3000 об/мин 20 минут при комнатной температуре или фильтрацией на 0,22μ 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. **Транспортировка 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 многократного замораживания / размораживания.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОМЫВКЕ

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 моющих циклов при 350-400 мкл на лунку для предотвращения фальшиво положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое лунок, 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, промывочного буфера.
5. При ручном промывании необходимо 5 циклов промывания при 350-400 мкл на лунку и аспирировать жидкость 5 раз. Если получены низкие результаты, увеличьте количество циклов промывания и время выдержки.
6. При аспирации жидкости из лунок, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорита натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
7. Концентрированный промывочный буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного планшета смешайте 30 мл концентрата с 570 мл воды. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем промывочного 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**.

ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛИСТАМИ

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. **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. 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 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 телят (FCS) взяты географических районов, где нет BSE/TSF.
17. Наконечники пипеток, флаконы, полоски и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при 121°C 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 раздражение кожи.

19. 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.
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.

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 (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 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. **Образование 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 голубой окрас в положительном контроле и HBsAg 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 HBsAg положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
8. **Измерение абсорбции:** Калибрируйте планшетный ридер яйечкой 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 анализируемых 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 лунки бланка от напечатанных величин образцов и контролей. Если считывается на планшетном ридере с двойным фильтром, не отнимайте ОП лунки бланка от напечатанных образцов и контролей.

1. Вычисление порогового значения (Cut-off/CO)**Значение CO = *Nc x 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 сбросить 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.

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 фонового определения (бланка).
3. Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фонового 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 величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие поверхностного антигена к гепатиту В. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные к HBsAg и поэтому пациенты, возможно, инфицированы вирусом гепатитом В.

Граничные значения: 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 HBsAg.

ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

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.

Специфичность	Образец	-	+
Доноры крови	2500	2447	56
Госпитализированные пациенты	300	274	27
	Подтвержд. положит.	Специфичность	Ошибочно положит.
Доноры крови	53	99,87%	3
Госпит. пациенты	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-HBs, анти-Hbe и анти-Hbc, 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	Ошибочно 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 Е/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 конечная чувствительность (нижний предел определения): Анализ демонстрирует чувствительность при СО 0,5 нг/мл (agr) и 0,5 нг/мл (adw, ay).

Воспроизводимость		Внутри анализа		Между анализами	
Тип образца	№	Средн. ОП	КВ %	Средн. ОП	КВ %
0,5нг/мл HBsAg	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 ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности. Однако в редких случаях некоторые HBV мутанты или субтипы 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, несоответствующим 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 трупных 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 нестабильность 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.

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