



**Набор ИФА
для качественного определения поверхностного
антигена гепатита В (HBsAb) в человеческой
сыворотке или плазме**

Кат. номер : E-HSB-1P
Количество : 96
Производитель: Dima Diagnostika (Германия)

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

Методика от 11-2005

НАЗНАЧЕНИЕ

1. Для исследования гуморального иммунитета к вирусу гепатита В.
2. Для пред-иммунного скрининга (определения положительных анти-HBs).
3. Как средство диагноза болезни печени.
4. Для установления сероконверсии после (активной или пассивной) вакцинации.
5. Для скрининга анти-HBs положительной крови как источника иммуноглобулина гепатита В.

ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Анализ является иммуноферментным на основании принципа «сэндвича».

HBsAg—анти-HBs— HBsAg-пероксидаза хрена+Субстрат

антиген твёрдой фазы	положительный образец	ферменто-меченное анти тело
-------------------------	--------------------------	--------------------------------

Полистирольные микротитрационные полосочные лунки покрыты поверхностным антигеном гепатита В, который имеет в себе антиген твёрдой фазы. Тестовый образец инкубируется в такой лунке. Анти-HBs при его наличии в образце, свяжется с антигеном твёрдой фазы. После этого добавляется HBsAg, который помечен ферментом пероксидазы хрена (HRP). При положительной реакции образуется комплекс твёрдой фазы антиген/анти-HBs/HBsAg-HRP. Инкубация с ферментом, гидропероксидом и TMB производит голубой окрас в тестовой лунке, который становится желтым, когда реакция останавливается серной кислотой. Если образец не содержит анти-HBs, тогда меченый антиген невозможно специфически обнаружить, только образуется слабый фоновый цвет.

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. Каждая лунка планшета покрыта поверхностным антигеном гепатита В и запечатана в алюминиевом мешке с силикагелевым пакетом как осушителем.
2. **Конъюгат:** 1 фл./8 мл (HRP-меченый HBsAg).
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.
2. Пипетки на 20 мкл, 100 мкл и 1000 мкл и т.д.. Не должны содержать металлических частей, которые могут вступать в контакт с жидкостью.
3. Одноразовые наконечники для пипеток.
4. Таймер.
5. Инкубатор (37⁰С).
6. Автоматический микропланшетный промыватель (также можно проводить вручную) с распределением 0,3 мл.

7. Микропланшетный считыватель с фильтром 450 нм.
8. Абсорбирующая ткань.
9. Перчатки.
10. Микропланшетный миксер.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ по БЕЗОПАСНОСТИ

Полоски и конъюгат содержат HBsAg. Раствор конъюгата и контроли извлекаются из человеческой донорской крови, которая была проверена надежными методами индивидуально на HBsAg также как и на антитела к ВИЧ (I+II), и дала отрицательный результат. Однако, поскольку никакой метод тестирования не может предоставить полную гарантию на отсутствие инфекционных носителей, все образцы человеческого происхождения нужно считать потенциально инфекционными и обрабатываться в перчатках.

Утилизируйте все образцы и используемые для проведения теста материалы как будто бы они содержали инфекционные носители. Микропланшет и оборудование после использования необходимо дезинфицировать, например, глутаральдегидом 2%, pH 7,5-8,0.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Если держать тестовые реагенты при 2-8⁰С, они остаются стабильными до окончания срока годности. После вскрытия алюминиевого пакета неиспользованные полоски нужно разместить в полиэтиленовой сумке вместе с пакетом с силикагелем и хранить при 2-8⁰С. После использования части тестовых реагентов: конъюгата TMB раствора, субстрата, концентрированного промывочного раствора или контролей, оставшиеся содержимое набора стабильно до окончания срока годности, если хранить при 2-8⁰С в закрытых оригинальных флаконах. Разбавленный промывочный раствор стабилен в течении 8 недель при 2-8⁰С.

ОБРАЗЦЫ

1. Сыворотка или плазма не должны быть микробиологически заражены при тестировании.
2. Добавки (кроме гентамицина сульфата или проклина) и повторное замораживание и размораживание могут дать ошибочные результаты.
3. Осадки, сгустки и клетки крови могут привести к ошибочно положительным результатам. Таким образом перед тестированием неразстворимый материал необходимо удалить из образцов путем центрифугирования.

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. В инкубаторе должна быть относительная влажность 90%.
3. Перед использованием убедитесь, что тестовые образцы контроли гомогенны.
4. Полоски использовать только один раз.
5. Все сосуды, используемые для приготовления раствора субстрата должны быть тщательно очищены и в конце промыты дистиллированной водой.
6. Во избежание загрязнения, не касайтесь верхнего края полосок пальцами.
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.
11. Не смешивайте компоненты разных наборов с разными номерами партий.

ПРОЦЕДУРА ПРОМЫВКИ

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.

ПРИГОТОВЛЕНИЯ

1. Разбавьте концентрированным промывочный буфер 1:25 дистиллированной водой. Концентрированный промывочный буфер необходимо привести к температуре 20-25°C.
2. Перед использованием дайте всем тестовым образцам, контролям, конъюгату, разбавленному промывочному раствору, субстрату и алюминиевому пакету, содержащему микропланшет и флаконы с ТМВ, достичь температуры окружающей среды.

ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. Откройте алюминиевый пакет и извлеките планшет необходимым количеством полосок. Неиспользованные полоски следует ранить в поставляемом полиэтиленовом пакете при наличии мешка с силикагелем (См. раздел Хранение и Стабильность). В процессе анализа полоски остаются в держателе.
2. В микропланшете оставьте **2 лунки (50 мкл)** для отрицательного контроля и **2 лунки (50 мкл)** для положительного контроля) и одну лунку как бланк.
3. Внесите **50 мкл** каждого тестируемого образца в остальные лунки.
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 вышеуказанным раствором 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 течении 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

Настройте выбранную лунку как бланк, считайте абсорбцию других лунок.

2. Вычисление cut-off значения

Значение cut-off = 2,1xN

Если N меньше 0,05, тогда N = 0,05. Если N больше или равно 0,05, тогда N соответствует его фактическому значению.

3. Результат анализа

Тест положительный если $S \geq \text{cut-off}$ значения

Тест отрицательный если $S < \text{cut-off}$ значения

Проверка действительности процедуры анализа:

Процедура анализа действительна только если $N < 0.1$ и $P > 1.0$.

Интерпретация результатов скринингового теста

Отрицательный результат означает, что проверенный образец или не содержит анти-HBs, или содержит анти-HBs ниже предела обнаружения данного анализа. Это будет отображено в пациентах. Не имеющих гуморального иммунитета к инфекционному вирусу гепатита В. Повторный положительный результат означает, что образец содержит антитела, реагирующие на HBsAg, что в общем указывает на гуморальный иммунитет к вирусу гепатита В.

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:

ЧМП «ДИАМЕБ»
Ул. Чернобола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005
Тел.: (0342) 775122
Тел/факс: (0342) 775612
E-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua