



HBc Ab

Ферментный иммуноанализ

Кат.№:4220

▽ 96 Тестов

[IVD]

Краткий протокол хода работы

- Шаг 1 Внесите в каждую лунку по 50 мкл Разбавителя образцов а затем внесите по 50 мкл калибраторов, контрольной сыворотки и разбавленной исследуемой сыворотки или плазмы образца, при этом омывайте одну лунку пустой для бланка.
- Инкубируйте 60 минут при 37оС
- Промойте 4-5 раз (350 мкл)
- Шаг 2 Внесите в каждую лунку по 100 мкл ферментного конъюгата
- Инкубируйте 60 минут при 37оС
- Промойте 4-5 раз (350 мкл)
- Шаг 3 Внесите в каждую лунку по 100 мкл раствора Хромоген/Субстрат
- Инкубируйте при КТ (18-30оС) 20 минут
- Шаг 4 Добавьте по 100 мкл Стоп-реагента
- Учитывайте абсорбцию при 450 нм и 620 нм

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Ферментный выявляющий иммуноанализ для определения антител к Кор Антигену Вируса Гепатита В (HBcAb) в сыворотке крови человека(-). Набор предназначен для скрининга крови и для наблюдения за хроническими пациентами в стадии лечения. Только для диагностики «in vitro».

ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ И ПОЯСНЕНИЯ

ПРИНЦИП ХОДА РАБОТЫ

Исследование основано на принципе «захвата антител», которые захватываются твёрдой фазой, покрытой анти-человеческими антителами.

После промывки удаляются все несвязавшиеся компоненты из образца и, в особенности, а специфические антитела связываются с твёрдой фазой и выявляются при добавлении очищенных препаратов рекомбинантного HBcAg, меченных моноклональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP)

После инкубации микролунки промывают, чтобы удалить несвязавшийся конъюгат и добавляют раствор Хромоген/Субстрата.

В присутствие Пероксидазы бесцветный субстрат гидролизует до окрашенного конечного продукта. Его оптическую плотность можно учесть, она пропорциональна количеству антител к HBcAg, присутствующим в сыворотке.

РЕАГЕНТЫ

Реагентов достаточно для 96 определений

Перед началом работы из надо довести до комнатной температуры.

Сорбированные антителами лунки (микроплашки) – 12 x 8 разборных лунок, сорбированных рекомбинантными антителами, запечатанными в пакетик с десикантом.

Отрицательный контроль - один флакон с 1 мл готового к работе контрольного материала светло жёлтого цвета.

Положительный контроль – 1 мл готового к работе контрольного материала

Важное замечание- Не смотря на то, что плазма крови была химически инактивирована, следует обращаться с этими компонентами, как с потенциально инфекционным материалом.

Калибратор один флакон с лиофилизированным реагентом. Для того чтобы его растворить, необходима вода (степень чистоты ЧДА) в количестве, указанном в таблице. Содержит, 4% BSA без ферментов, 0,2 мг/мл гентамицин сульфата и 0,1 % Kathon GC в качестве консерванта.

Важные замечания

1.Объём, необходимый для растворения содержимого флакона, может отличаться от лота к лоту. Пожалуйста, обращайтесь внимание, какой объём указан на этикетке флакона.

2.Не смотря на то, что плазма крови была химически инактивирована, следует обращаться с этими компонентами, как с потенциально инфекционным материалом.

Промывочный буфер

(20 X концентрат) - один флакон, содержащий 60 мл 20 X концентрированного раствора. После разведения, рабочий раствор содержит 10 mM фосфатный буфер, pH 7,0+/-0,1; 0,05% Твин 20 и 0,1 % Kathon GC

Ферментный конъюгат

(Иммунокомплекс) один флакон, содержащий 16 мл готового к работе и окрашенного в красный цвет раствора иммунокомплекса, полученного из моноклональных антител к HBcAg, связанным с очищенным рекомбинантным HBcAg, и меченным пероксидазой хрена. MOPS буфер с pH 6,2-6,7. Содержит бычий белок, стабилизированный 0,02% метилизотиазолоном и бромонитродииоксаном, 20 ppm Проклин 300.

Хромоген Substrate (один флакон с 20 мл готового к работе 50 mM цитрат-фосфатного забуференного раствора с pH 3,5-3,8, 4% диметилсульфоксидом, 0,03% тетраметилбензидином (ТМБ) и 0,2% перекисью водорода (H₂O₂))

Внимание: для сохранности, реагент нужно содержать защищённым от света, поскольку он чувствителен к избыточному освещению.

Разбавитель образца - два флакона по 60 мл каждый с готовым к работе раствором голубого цвета, 100 mM раствор Трис буфера, pH 7,4+/-0,1, для разведения образцов, вместе с 0,5% Твином 20, 2 % казеином, 0,1% Катонем GC и 0,09% азидом натрия в качестве консерванта.

Stop паствор(1 флакон с 20 мл готовой к работе 0,3 M серной кислотой)

Адгезивная плёнка

ДРУГИЕ НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Поверенные пипетки (100 мкл и 50 мкл), одноразовые наконечники, вода (ЧДА – двойной дистилляции или деионизованная), профильтрованная через угольный фильтр, для удаления окисляющих химических соединений, используемых в качестве дезинфектанта).

Таймер на 60 минут и выше.

Лабораторная абсорбирующая бумага

Поверенный термостатируемый инкубатор для ИФА рплашек (сухой или водяной), установленный на 37оС (+/- 1оС – допустимая погрешность).

Калиброванный ИФА ридер с длиной волны 450 нм (рабочая длина волны) и по возможности с фильтрами бланка, с длиной волны 620-630 нм.
Калиброванный ИФА промыватель.
Вортекс или похожее оборудование для перемешивания.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты следует хранить при 2±8°C.
Срок годности указан на этикетке каждого компонента набора.
Стабильность реагентов ограничена после того, как флакон был впервые открыт или реагент приготовлен.

Сорбированные антителами лунки (микроплашки) – Использование – упаковка открывается с края, противоположного тому, на котором написан код. Это удобно, для того, чтобы сохранить идентификационные данные. Извлеките из упаковки необходимое количество стрипов, неиспользуемые стрипы поместите назад в упаковку, в полиэтиленовый пакет с десикантом, выпустите воздух и закройте упаковку, прижимая зиппер.

Контрольные сыворотки (отрицательная и положительная) – Готовы к работе. Перед использованием хорошенько перемешайте содержимое каждого флакона.

Калибровочная кривая - Растворите содержимое флакона в ЧДА воде, (объем указан на этикетке). Перед использованием хорошо перемешайте на вортексе. Растворённая контрольная сыворотка готова к работе.

Внимание: После растворения контрольная сыворотка не сохраняет долго свою стабильность. Её надо алиquotировать и хранить при – 20oC.

Промывочный буфер

Содержимое одного флакона с концентрированным раствором следует разбавить в 20 раз ЧДА водой. Для этого надо довести объём до 1200 мл и хорошо перемешать перед использованием. При подготовке буфера не допускайте образования пены и появления пузырьков, поскольку они могут осложнить процесс промывки и снизить его эффективность.

Ферментный конъюгат

Готов к работе. Перед использованием хорошо перемешать. Не допускайте контаминации жидкости окисляющими химикатами, пылью или микробами. Не используйте при ярком освещении, с окисляющими реагентами или на металлических поверхностях. Если этот реагент необходимо перенести, используйте только пластмассовые и, по возможности, стерильные одноразовые контейнеры.

Разбавитель образца - готов к работе. Хорошо перемешать перед использованием.

Хромоген Substrate – готов к работе. Перед использованием хорошо перемешать. Не допускайте контаминации жидкости окисляющими химикатами, пылью или микробами. Не используйте при ярком освещении, с окисляющими реагентами или на металлических поверхностях. Если этот реагент необходимо перенести, используйте только пластмассовые и, по возможности, стерильные одноразовые контейнеры.

Stop паствор Готов к работе. Перед началом работы хорошо перемешать.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Только для диагностики ин ВИТРО

Это тестирование может выполняться только обученным и хорошо подготовленным персоналом. Следует строго соблюдать рекомендации руководств по работе в медицинских лабораториях и строго придерживаться инструкции по выполнению теста.

Недопустимо пипетировать ртом образцы и реагенты, нельзя допускать контакта с повреждёнными кожными покровами и слизистыми. При работе с образцами, обязательно надевать перчатки и по окончании тестирования тщательно мыть руки. Нельзя курить, принимать пищу и пить в помещении, где работают с образцами или реагентами для тестирования.

Контрольные сыворотки, (положительный и отрицательный контроли), входящие в состав набора, были протестированы на ВИЧ- и ВГС-Ат, а так же на HbsAg и показали отрицательные результаты. Но, тем не менее, с ними следует обращаться, как с потенциально инфекционным материалом, т.е. так же, как с образцами пациентов, и соблюдать все меры предосторожности, согласно местным правилам по работе с инфекционными материалами.

Стандартный контроль и отрицательный контроль, а так же буфер для образцов и промывочный буфер, содержат в качестве консерванта Катон CG. Нельзя допускать, чтобы это вещество попадало на слизистые и кожу.

Пероксид мочевины может вызвать ожоги. Поэтому с ним следует обращаться, соблюдая все меры предосторожности.

Стоп-реагент содержит 0.5 М серную кислоту. Избегайте контакта с кожей и одеждой. Если стоп-реагент попал на кожу, его необходимо смыть водой.

Все реагенты и материалы, находившиеся в контакте с потенциально инфекционными образцами, должны быть обработаны доступными дезинфектантами или автоклавырованы при 121 °C в течение 1 часа. ВНИМАНИЕ: Чтобы предотвратить образование ядовитых газов, все жидкие отходы, содержащие стоп-реагент, следует нейтрализовать перед тем, как поместить их в раствор гипохлорита.

ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦА

1. Кровь набирают обычной процедурой венепункции и сыворотку отделяют, используя стандартную технологию подготовки образца для клинических лабораторных исследований. Не было отмечено никакого влияния на конечный результат цитрата, ЭДТА, гепарина.
2. Не допускайте добавления каких-либо консервантов к образцу; особенно азида натрия, поскольку этот химикат может повлиять на ферментную активность конъюгата.
3. Образцы надо чётко и ясно идентифицировать, (по имени или номеру), чтобы не допустить перепутывания или ошибочной интерпретации результатов. При использовании набора для скрининга донорской крови, настоятельно рекомендуется применять систему штрих-кодирования и электронного считывания.
4. Гемолизированные (красные) или липемичные (молочные) образцы надо выбрасывать, поскольку в них возможны ложные результаты. Образцы с остатками фибрина, или тяжёлых фрагментов микробных филаментов или теллец, тоже следует выбросить, так как они тоже повышают вероятность ложных результатов.
5. Сыворотку можно хранить при +2-8oC до пяти дней после взятия крови. Если предполагается более длительный период хранения, её необходимо заморозить и хранить при -20oC в течении нескольких месяцев. Замороженные образцы можно размораживать не более одного раза, иначе возможны ошибочные результаты.
6. Если в образце присутствуют форменные элементы, его следует отцентрифугировать при 2000 об/мин в течение

20 мин, или профильтровать, используя 0,2 – 0,8 мкл фильтры для очищения образца.

ХОД РАБОТЫ

ПОДГОТОВИТЕЛЬНАЯ ПРОЦЕДУРА

1. Проверьте срок годности каждого компонента набора. Он напечатан на этикетке. Не используйте просроченные наборы.
2. Проверьте жидкие компоненты. Они не должны содержать видимые глазом частички или агрегаты. Убедитесь, что раствор хромогена/субстрата бесцветный или бледно-голубой. Для этого, наберите немного раствора в стерильную пластиковую пипетку. Проверьте, чтобы не было повреждения флаконов или пролива жидкостей из них во время транспортировки наборов. Проверьте, чтобы все алюминиевые упаковки были целостными и неповреждёнными.
3. Разбавьте всё содержимое 20 X концентрата Промывочного буфера, как описано выше.
4. Растворите Контрольную Сыворотку, как описано выше.
5. Перед началом работы, доведите все компоненты набора до комнатной температуры (приблизительно в течение одного часа) и хорошо перемешайте.
6. Установите термостат на 37oC и подготовьте ИФА промыватель. Выполните процедуру прайм-промывки и ополаскивания разведённым буфером, в соответствии с рекомендациями производителя. Установите необходимое количество промывочных циклов, как указано в валидационном процессе для каждого конкретного набора.
7. Проверьте, включён ли ИФА ридер. Он должен прогреться хотя бы 20 минут перед чтением результатов.
8. Если используется автоматизированная рабочая станция, включите её, проверьте все настройки и убедитесь, что протокол запрограммирован верно.
9. Проверьте, чтобы микроплашки соответствовали требуемому объёму.
10. Проверьте функциональность и доступность остального используемого оборудования.
11. В случае каких-либо проблем, не начинайте работу и посоветуйтесь с поставщиком.

ХОД РАБОТЫ

КАК ПРИМЕР, СХЕМА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Бланк	Обр. 2										
B	НК	Обр. 3										
C	НК	Обр. 4										
D	НК	Обр. 5										
E	Кал	Обр. 6										
F	Кал	Обр. 7										
G	ПК	Обр. 8										
H	Обр. 1	Обр.9										

Важные замечания

1. Во время инкубации стрипы должны быть накрыты адгезивной плёнкой. Только при работе на автоматизированной системе стрипы не надо накрывать.

Исследование должно выполняться в строгом соответствии с протоколом, приведенным ниже. Точно соблюдайте время и температуру инкубации для всех исследуемых образцов.

1. Вставьте в рамку необходимое количество лунок или стрипов, тщательно идентифицируя лунки для образцов, и лунки для контролей и стандартов.
2. Оставьте лунки A1 пустой – для бланка.
3. Внесите во все лунки по 50 мкл разбавителя для образцов.
4. Внесите по 50 мкл отрицательных контролей в триплетах, 50 мкл калибратора в дублях, 50 мкл положительного контроля и по 50 мкл образцов в соответствующие лунки.
5. Инкубируйте микроплашку в течение 60 минут при +37oC.
6. По окончании первой инкубации, промойте микроплашку, как описано в главе (Рекомендации и предупреждения)
7. Внесите по 100 мкл ферментного конъюгата во все лунки, кроме A1 и B1. Инкубируйте микроплашку при 37oC в течение 60 минут.
8. По окончании второй инкубации, промойте микроплашку, как описано в главе (Рекомендации и предупреждения, пункт 20)
9. Внесите во все лунки, включая A1, раствор хромогена/субстрата.
10. Инкубируйте плашку при комнатной температуре, защищённой от яркого света в течение 20 минут. В лунках с положительными образцами, контрольной сывороткой и положительными калибраторами должно появиться голубоватое окрашивание.
11. Внесите по 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку в такой же последовательности, в которой был выполнен шаг 9. При этом остановится ферментная реакция. Внесение стоп реагента сопровождается изменением цвета положительного контроля и положительных образцов с голубого на жёлтый.
12. Измерьте интенсивность окраски растворов в каждой лунке, как описано в главе «Рекомендации и предупреждения», используя фильтр с длиной волны 450 нм для чтения ипо возможности фильтр 620-630 нм – для вычитания фона. Бланк аппарата должен быть установлен по лункам A1 и B1.

2. Будьте внимательны и не прикасайтесь к внутренней поверхности лунки наконечниками пипетки и не погружайте его в жидкость, чтобы не допустить перекрёстной контаминации.
3. Не инкубируйте плашки на ярком свету – это может привести к фоновому окрашиванию

4. Если второй (референсный) фильтр недоступен, убедитесь, что на дне лунок нет отпечатков пальцев и читайте только при 450 нм.
5. В идеале учёт результатов должен проводиться сразу же после внесения стоп-реагента и не

позже, чем через 20 минут. Более длительное время приводит к окислению и появлению фона.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Валидационная проверка выполняется по контролям каждый раз, когда используется набор, для того чтобы проверить, соответствуют ли полученные значения ОП и соотношения Обр/СО ожидаемым значениям. Контроль должен вписываться в следующие пределы:

Бланк	ОП < 0.050
Отрицательный контроль	ОП после установки бланка ОП > 1,000
Калибратор (2 PEI U/ml)	Co/C > 1, CV% < 20%
Положительный контроль	ОП < 0.200

Если результаты тестирования соответствуют выше обозначенным требованиям, можно переходить к учёту результатов.

Исправление ошибок

В случае, если полученные результаты не соответствуют выше указанным условиям, проверьте следующие моменты:

Проблема	Что надо проверить
Бланк > 0.100	1. Раствор Хромоген/Субстрат не был загрязнён
Отрицательный контроль < 1.000	1. Убедитесь, что процедура отмывки выполняется правильно, валидирована и соответствует требованиям протокола контроля качества; 2. Убедитесь, что используются правильные растворы для отмывки и что до начала процедуры вошер был предварительно промыт; 3. Убедитесь, что в ходе работы не были допущены ошибки (распределение положительных калибраторов вместо Калибратора 1 (0 Ед/мл)); 4. Убедитесь, что не было контаминации положительными образцами или контролями Калибратора 1 или лунок, в которые он раскапан, а так же ферментного конъюгата; 5. Убедитесь, что микропипетки не контаминированы положительными образцами или ферментным конъюгатом. 6. Убедитесь, что иголки вошера не забиты сгустками и не поломаны.
Калибратор Co/S < 1 CV > 20%	1. Убедитесь, что процедура тестирования соблюдена правильно. 2. Убедитесь, что не было ошибок во время внесения образцов в лунки 3. Убедитесь, что процедура отмывки выполняется правильно, валидирована и соответствует требованиям протокола контроля качества; 4. Убедитесь, что нет внешней контаминации калибраторов.
Положительный контроль > 0.200	1. Убедитесь, что процедура тестирования соблюдена правильно. 2. Убедитесь, что не было ошибок во время внесения образцов в лунки (ошибочное распределение образцов); 3. Убедитесь, что процедура отмывки выполняется правильно, валидирована и соответствует требованиям протокола контроля качества; 4. Убедитесь, что нет внешней контаминации стандартов.

Если и после устранения всех ошибок эти проблемы продолжают, пожалуйста, обратитесь к поставщику за рекомендациями по дальнейшим мерам.

Результаты

$$\text{Cut-Off (Co)} = \frac{(\text{NC} + \text{PC})}{5}$$

Интерпретация результатов

Обр/СО	Интерпретация
<0.9	Отрицательный
0.9-1.1	Сомнительный
>1.0	Положительный

Важные общие замечания

1. Если расчёт результатов выполняется операционной системой на автоматизированной ИФА станции, убедитесь, что для расчёта используется правильная формула для построения калибровочной кривой, что образцы рассчитаны правильно, и что интерпретация результатов выполнена правильно.
2. Результаты должны интерпретироваться при наблюдении лабораторного работника, для того чтобы уменьшить возможность ошибочной интерпретации или неправильного расчёта.
3. Положительный результат указывает на ВГБ инфекцию, поэтому пациенту необходимо соответствующее лечение.
4. Если результаты передаются из лаборатории в другое медицинское заведение, пожалуйста, будьте предельно внимательны, чтобы не передать ошибочную информацию.
5. Диагноз инфекции вирусного гепатита может быть установлен только высоко квалифицированным доктором.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценка технических характеристик проводится согласно отчёту Common Technical Specifications or CTS (art. 5 Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC).

Предел детекции

PEI U/ml	Lot 1001	Lot 0702	Lot 0702/2	Lot 1202
5	22.6	18.0	19.0	17.7
2.5	8.0	5.5	5.4	5.0
1.25	1.1	1.3	1.0	1.0
0.625	0.4	0.4	0.4	0.4

Диагностическая чувствительность

Определялась, как способность набора уловить наименьший положительный скор искомого анализата.

Диагностическая чувствительность проверяли внутрилабораторно и межлабораторно в специализированных клинических лабораториях, на панелях образцов, классифицированных, как положительные на наборах, утверждённых FDA, США.

Положительные образцы были получены от разных пациентов и при разных патологиях ВГВ (острые и хронические гепатиты).

Диагностическая специфичность

Определялась, как способность набора правильно определить отрицательный скор при отсутствии искомого анализата. 100%.

Диагностическая специфичность проверяли внутрилабораторно и межлабораторно в специализированных клинических лабораториях, на панелях образцов, классифицированных, как отрицательные от нормальных индивидов и доноров крови на наборах, утверждённых FDA, США.

Точность

Точность рассчитывали на трёх образцах, проверенных в 16 репликах при трёх прогонах, выполненных на трёх разных сериях наборов.

lot # 1202

Negative Control (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	1.943	1.939	1.924	1.935
Std. Deviation	0.081	0.078	0.103	0.087
CV %	4.2	4.0	5.3	4.5

Calibrator (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	0.143	0.147	0.148	0.146
Std. Deviation	0.014	0.017	0.018	0.016
CV %	9.8	11.4	12.1	11.1
Co/S	2.8	2.7	2.6	2.7

Negative Control (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	2.163	2.110	2.106	2.126
Std. Deviation	0.105	0.088	0.139	0.111
CV %	4.9	4.2	6.6	5.2

Calibrator (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	0.182	0.193	0.195	0.190
Std. Deviation	0.018	0.023	0.019	0.020
CV %	10.0	12.0	9.9	10.6
Co/S	2.5	2.2	2.3	2.3

lot # 0702/2

Negative Control (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	2.278	2.098	2.130	2.169
Std. Deviation	0.135	0.126	0.159	0.140
CV %	5.9	6.0	7.5	6.5

Calibrator (N = 16)

Mean values	1 st run	2 nd run	3 rd run	Average value
OD _{450nm}	0.193	0.190	0.199	0.194
Std. Deviation	0.023	0.023	0.027	0.025
CV %	12.1	12.3	13.5	12.6
Co/S	2.4	2.2	2.2	2.3