

## НАБОР ИФА

# ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ЯДЕРНОМУ АНТИГЕНУ ВИРУСА ГЕПАТИТА В (HBcAb)

### 1704-12, HBcAb

Каталог. № : 1704-12  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 03-26-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	HBcAb
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурентный ИФА
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	50 мкл сыворотки
Специфичность	99 %
Чувствительность	99.92 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12 -18 месяцев

\*Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для медицинского заключения. Принять во внимание историю болезни пациента и дальнейшие тесты.

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является набором иммуноферментного анализа (ИФА) для качественного определения HBcAb в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для использования в медицинских лабораториях для диагностики и обращения с пациентами инфицированных вирусом 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 (HBsAg), который появляется вскоре после инфекции - важный белок структуры оболочки вируса. HBsAg - ключевой серологический маркер для обнаружения и диагностики HBV и обнаруживаемая в крови в течение острой фазы болезни. Очищение после лечения указывает на восстановление, в то время как присутствие в течение больше чем полгода после инфекции указывает на возможное прогрессирование к длинной хронической стадии носителя. В течение острой фазы инфекции развивается сильная иммунологическая реакция увеличиваются титры нейтрализующих антител HBcAg (анти-HBc), которые являются указателем выздоровления. Серологическое обнаружение анти-HBc стало важным методом для обращения с пациентами, инфицированными HBV, предвараемых изучений распространенности и контроля реципиентов после прививки синтетическими и естественными HBsAg вакцинами.

#### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Набор HBcAb ELISA основан на твердой фазе, принцип одношагового инкубационного конкурентного анализа. Когда анти-HBc присутствует, он конкурирует с моноклональными анти-HBc, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP-конъюгат) за фиксированное количество очищенного HBsAg, предварительно нанесенного в лунки. Если анти-HBc не присутствует,

конъюгированные с пероксидазой хрена анти-HBc будут связываться с антигенами внутри лунок. В ходе промывки, любой несвязанный HRP-конъюгат удаляется. После добавления растворов хромогена А и В в лунки и в процессе инкубации, происходит окрашивание в синий цвет, когда бесцветные хромогены гидролизуют связанный конъюгат пероксидазы хрена. После остановки реакции с помощью серной кислоты, синий цвет изменится на желтый. На присутствие антител к HBcAg в образце указывает слабое окрашивание или его отсутствие.

Схема анализа: См. оригинал инструкции.

#### КОМПОНЕНТЫ

- **Микролуночный планшет, 1 планшет**  
Пустые микролуночные полоски, зафиксированные в белом держателе полосок. Планшет запечатан в пакете из фольги с осушителем.  
8x12/12x8-луночных полосок на планшет. Каждая лунка содержит очищенные HBsAg. Микролуночные полоски могут использоваться отдельно.  
Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтоватая жидкость во флаконе с зеленой крышкой  
1 мл в флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к анти-HBc.  
Консерванты: 0,1% Проклин 300  
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой  
1 мл во флаконе  
Очищенный анти-HBc, 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  
6,5 мл в флаконе  
анти-HBc антитела, конъюгированные пероксидазой хрена  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**  
**Разбавить перед использованием**  
Бесцветная жидкость в бутылке с белой крышкой  
30 мл в бутылке  
РН 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)  
Концентрат необходимо разбавить 1:20 дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабильны 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  
7 мл во флаконе  
Раствор перекиси мочевины  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой  
7 мл во флаконе  
ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны месяц при 2-8°C.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с белой крышкой.  
7 мл во флаконе  
Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **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

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,  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .
8. Микрошейкер 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.

#### СБОР, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранной венопункцией, должна стуситься природным путем. Необходимо проследить, что б 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 0,22 микронный фильтр. Плазма, собранная в ЭДТА, 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  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Образцы, что не будут анализироваться в течение 3 дней необходимо заморозить до  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже. Избегайте многократных замораживания / оттаивания.

#### 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 ячеек, 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 вносятся 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 ячеек, 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  $2-8^{\circ}\text{C}$ , **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

#### **ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОФЕССИОНАЛАМИ**

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 ( $18-30^{\circ}\text{C}$ ) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
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 ячеек; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
6. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
7. Не допускайте высыхания ячеек после промывания, немедленно проводите следующий этап, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.

8. Избегайте длительных перерывов между этапами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех ячеек.
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  $37^{\circ}\text{C}$ .
12. При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну ячеек.
13. При измерении планшетным считывателем, 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 телянка (FCS) взятые географических районов, где нет BSE/TSE.
17. Наконечники пипеток, флаконы, полоски и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при  $121^{\circ}\text{C}$  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 раздражении 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 ( $18-30^{\circ}\text{C}$ )** 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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$** . 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.

- 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 синий окрас в положительном контроле и HbсAb положительном образце.
- Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл** стоп раствора в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и анти-Hbс положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
- 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 течение **5 минут** после остановки реакции).

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый планшет должен приниматься отдельно, несмотря на количество анализируемый 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 x 0.5**

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

##### Пример:

- Вычисление Nc:  
№ лунки В1      С1      D1  
ОП отрицательных контролей    1.720    1.715    1.717  
Nc = 1.717
- Вычисление порогового значения (CO) = 1.729 x 0.5 = 0.858

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 каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

- Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор меньше 0,080 при 450 нм.
- Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фонового определения (бланка).
- 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 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-Hbс и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В. Повышенные концентрации анти-Hbс указывают на выздоровление и иммунитет к HBV.

**Граничные значения (S/CO = 0,9-1,1):** 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 HbсAb.

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

**Клиническая специфичность:** клиническая специфичность была определена на панеле образцов, полученных от 1683 здоровых доноров крови и 145 не диагностированных госпитализированных пациентов.

**Клиническая чувствительность:** клиническая чувствительность этого набора была вычислена на группе образцов полученных от 975 пациентов с гепатитом В с четко характеризированной клинической историей, что основывается на анализах для определения HbсAb, HbeAb, анти-Hbс, анти-Hbe и анти-Hbc, Лицензированный анти-Hbс тест использовался как подтверждение анализа. Оценка результатов дана ниже. Результаты, полученные в индивидуальной лаборатории, могут отличаться.

Специфичность	Образцы			Полож.	Специфичность	Ложно полож.
	К-во	-	+			
Доноры	1683	566	1117	1115	99.64 %	2
Пациенты	145	80	65	65	100 %	0
ВСЕГО	1828	646	1182	1180	99.82 %	2
Чувствительность	Образцы			Полож.	Чувствительность	Ложно отриц.
	К-во	-	+			
Острая	429	11	417	418	99.76 %	1
Хроническая	105	0	105	105	100 %	0
Выздоровление	441	5	436	436	100 %	0
ВСЕГО	975	16	958	959	99.92 %	1

#### Аналитическая специфичность

- Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HIV, HCV, CMV и TP.
- Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Ед/мл.
- На рабочие характеристики анализа не влияют повышенные концентрации билирубина, гемоглобина и триолеина.
- Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

Воспроизводимость		Внутри анализа		Между анализами	
Тип образца	№	Средн. ОП	КВ %	Средн. ОП	КВ %
Слабо положительный	10	0.639	5.8	0.645	6.4
Умеренно положительный	10	0.394	7.4	0.404	8.0
Сильно положительный	10	0.012	21	0.017	22
Отрицательный контроль	10	1.768	4.5	1.702	4.6

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- 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 подтипы могут оставаться неопределяемыми. Антигены могут быть неопределяемые во время ранней стадии заболевания и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.
- 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.
- Любые положительные результаты должны интерпретироваться в сочетании с клинической информацией пациента и другими результатами лабораторных анализов.
- Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные этапы процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Преобладание маркера влияет на величины анализа.
- 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.
- Это качественный анализ и результаты не могут использоваться для измерения концентрации антигенов.

## **ПОКАЗАТЕЛИ 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.



### **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

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