



## Набор ИФА для определения антител класса IgM к ядерному антигену вируса гепатита В

Кат. номер : 1778-12  
Количество : 96  
Производитель : DAI (США)

Методика от 09-04-2010

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

Анализ	HBcAb IgM ELISA
Метод	Иммунсорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Непрямой ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный - положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	100 мкл сыворотки
Специфичность	99,3 %
Чувствительность	98,4 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12-18 мес.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Этот anti-HBc IgM набор является набором иммуноферментного анализа для качественного определения антител класса IgM к ядерному антигену вируса гепатита В в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для использования в клинических лабораториях для диагностики или терапии пациентов с инфекцией вируса гепатита В.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

(См. в оригинале инструкции).

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этим набором используется ИФА твердофазового захвата антитела с двухэтапной инкубацией. Полистироловые микролуночки предварительно покрыты антителами к человеческому IgM (анти-μ цепь). Добавляются образцы сыворотки /плазмы пациентов, и во время первой инкубации любые IgM антитела захватываются в лунке. После вымывания всех других компонентов образца и частично IgG антител, специфический IgM, захваченный в твердой фазе определяется добавлением очищенного HBcAg, меченного анти-HBc моноклональным антителом, конъюгированным пероксидазой хрена. Во время второй инкубации, конъюгированные антигены реагируют определенно только с анти-HBc IgM антителами и после промывания для удаления несвязанных конъюгатов добавляется раствор хромогена.

В присутствии (анти-μ)-(анти-HBc IgM)-(HBcAg-Ab (HRP)) иммунокомплекса, бесцветные хромогены гидролизуются связыванием HRP конъюгата с продуктом синего цвета. Синий окрас изменяется на желтый после остановки реакции серной кислотой. Количество окраса измеряется и пропорционально количеству антитела в образце. Лунки, содержащие образцы отрицательные к анти-HBc IgM антителам, остаются бесцветными.

### Схема принципа анализа: ИФА захвата антитела

(См. в оригинале инструкции).

### КОМПОНЕНТЫ

- **Микролуночный планшет**, зафиксированные в белом держателе пустые микролуночные полоски. Планшет запечатан в пакете из фольги с осушителем.  
**8x12/12 8-луночные** полоски на планшет.  
Каждая лунка содержит анти-IgM антитела (анти-μ цепь). Микролуночные полоски могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Желтая жидкость в флаконе с зеленой крышкой.  
0,5 мл в флаконе.  
Протеин-стабилизирующий буфер, не реагирующий к анти-HBc IgM. Консерванты: 0,1% Проклин 300. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8°C.

- **Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость в флаконе с красной крышкой.  
0,5 мл в флаконе  
Анти-HBc IgM антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере. Консерванты: 0,1 % Проклин 300. Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Реагент HRP-конъюгата, 1 фл (12 мл)**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой  
6 мл в флаконе. Очищенный HBcAg, конъюгированный пероксидазой хрена, меченный моноклональным анти-HBc. Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с красной крышкой.  
50 мл в бутылке. PH 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, стабильны 1 неделю при комнатной температуре или 2 недели при 2-8°C.
- **Раствор хромогена А, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой.  
7 мл в 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 в флаконе. ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте. Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Стоп-раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой.  
7 мл в флаконе. Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **Пластиковый герметичный пакет, 1 шт.**  
Для неиспользуемых полосок
- **Картон для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения лунок.
- **Инструкция, 1 экз.**

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ, ЧТО НЕ ПОСТАВЛЯЕТСЯ

1. Свежая дистиллированная или деионизированная вода
2. Одноразовые перчатки и часы
3. Контейнер для возможно загрязненных материалов.
4. Одноразовые V-образные кокетки.
5. Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
6. Промокающая ткань или чистое полотенце.
7. Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5°C.
8. Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный считыватель, одиночная длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
10. Микропланшетная система для аспирации / промывания.
11. Обычный солевой раствор для разбавления образцов.

### СБОР ОБРАЗЦОВ, ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная 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 и 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 многократных замораживания / оттаивания.
3. **Приготовление образцов:** Каждый образец следует разбавить 1:1000 обычным солевым раствором.

### СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВАНИЮ

1. Правильная процедура промывки важна для получения корректных и точных данных.
2. Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный промыватель хорошего качества. В

основном требуется не менее 5 промывочных циклов при 350–400 мкл на лунку для предотвращения ошибочно положительной реакции.

- Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое лунок, а дайте возможность планшетному промывателю автоматически аспирировать его.
- Мы рекомендуем калибровать промыватель. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносится достаточное количество объема, промывочного буфера.
- 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.
- При аспирации жидкости из лунок, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
- Концентрированный промывочный буфер необходимо разбавить 1:20 перед использованием. Для одного планшета смешайте 50 мл концентрата с 950 мл воды до конечного объема 1000 разбавленного промывочного буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем промывочного буфера.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2–8°C, **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

ТОЛЬКО для диагностики IN VITRO.

### ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КВАЛИФИЦИРОВАННЫМ ПЕРСОНАЛОМ

ИФА является чувствительным к температуре и времени. Для точных результатов строго следуйте инструкции.

- Не меняйте реагенты разных партий и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
- Убедитесь, что все реагенты соответствуют своей партии. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
- Приведите реагенты к комнатной температуре (18–25°C) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием.
- После использования поместите реагенты при 2–8°C.
- Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности лунок; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания.
- При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
- Не допускайте высыхания лунок после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении реагента.
- Избегайте длительных перерывов между этапами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех лунок.
- Калибруйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
- Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
- Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37°C.
- При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну лунок.
- При измерении планшетным считывателем, рекомендуется измерение при 450 или при 450 с референтной длиной волны 630 нм.
- Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированы. Строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
- Наконечники пипеток, флаконы, полоски и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавать 1 час при 121°C или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
- 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.
- На ферментативную 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.

### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Приготовление реагентов:** Приводите реагенты и образцы к комнатной температуре (18–30°C) по крайней мере 15–30 минут.

Проверьте концентрат промывочного буфера, нет ли 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. Пометьте три лунки как отрицательный контроль (напр. B1, C1, D1), две лунки как положительный контроль (напр. E1, F1) и одну как бланк. (A1 – ни образцы ни HRP-конъюгат не должен добавляться в лунку бланка). Используйте число полосок, необходимое для анализа.

- Разбавления образца:** Разбавьте образцы 1:1000 обычным солевым раствором. Не разбавляйте контроли, они поставляются готовыми к использованию.
- Добавление образца:** Добавьте по 100 мкл образцов в каждую лунку и 100 мкл положительного и отрицательного контролей в соответствующие лунки.  
**Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.**
- Инкубация (1) образца:** Накройте планшет и инкубируйте 30 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.
- Промывка (1):** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку 5 раз промывочным буфером. Каждый раз выдержите лунки 30–60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
- Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте 100 мкл HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
- Инкубация HRP-конъюгата (2):** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте 30 минут при 37°C.
- Промывка (2):** После окончания инкубации, удалите и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку 5 раз разбавленным промывочным буфером как в этапе 5. Каждый раз выдержите лунки 30–60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
- Закрашивание:** 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. Ферментативная реакция между хромогеном А/В вырабатывает голубой окрас в лунках положительного контроля и положительного образца анти-Hbc IgM.
- Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите 50 мкл стоп раствора в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В лунках положительных контролей и анти-Hbc IgM положительных образцов развивается интенсивный желтый окрас.
- Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель лункой бланка и считайте абсорбцию при 450 нм. Если используется аппарат 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).

### ИНТЕРПРИТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый планшет при вычислении результатов должен рассматриваться отдельно, несмотря на количество 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.

- Вычисление порогового значения (CO) = Nc\*2,1**

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей.

Пример вычисления порогового значения:			
1. Вычисление Nc:			
№ лунки	B1	C1	D1
ОП отр. контролей	0,02	0,012	0,016
Nc=0,016			
(Среднее значение ниже 0,05, поэтому его взяли как 0,05)			
2. Вычисление величины исключения (CO) = 0,05 * 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

Результаты анализа считаются действительными при их соответствии критериям контроля качества. Каждой лаборатории рекомендуется устанавливать соответствующую систему контроля качества с помощью контрольного материала, аналогичного или идентичного анализируемому образцу.

- Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогена и стоп раствор, менее чем 0,080 при 450 нм.
- Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм или при 450 нм после слепой пробы.
- Значение ОП отрицательного контроля должна быть равна или ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после слепой пробы.

### 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 IgM антител к вирусу гепатита В ядерного антигена. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HBV.

**Положительные результаты (S/CO≥1):** образцы дали абсорбцию выше или равную величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие IgM антител к гепатиту В ядерного антигена. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HBc и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом В.

**Граничные (S/CO=0,9-1,1):** Образцы с абсорбцией **величины исключения** между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HBc.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой.

### РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

**Клиническая специфичность:** анализа определена на панели образцов, полученных для 2500 здоровых доноров крови и 230 недиагностированных госпитализированных пациентов. Повторно реактивные образцы и положительные образцы, подтвержденные референсным тестом, не были включены в вычисление специфичности.

**Чувствительность:** Клиническая чувствительность набора была оценена тестированием образцов полученных для 548 индивидов с вирусом гепатита В с ярко выраженной клинической историей, что базируется на референсных анализах HBsAg, HBeAg, анти-HBs, анти-HBe и анти-HBc. Эта панель включает острого, хронического и восстановочного гепатита В. Лицензионный анти-HBc IgM ELISA тест использовался как подтверждающий. Полученные результаты показаны в таблице (см. в оригинале инструкции на англ. языке). Результаты, полученные в отдельных лабораториях, могут отличаться. (Пример распространенности маркера при определенном количестве пациентов, инфицированных вирусом гепатита В см. в оригинале инструкции).

### Аналитическая специфичность

- Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HCV, HIV, HAV, HBV, CMV, HTLV и TP.
- Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Е/мл. На характеристики этого анализа не влияют повышенная концентрация билирубина, гемоглобина и триопина.

(См. таблицу в оригинале инструкции).

### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ИФА. Отрицательный результат при определении антитела не исключает возможность инфекции. Антитела могут не определяться во время ранних стадий заболеваний и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.

- Если после повторного анализа первично реактивных образцов результаты анализа остаются отрицательными, эти образцы необходимо считать неповторяемыми (ошибочно положительными) и интерпретировать как отрицательные. Как и в других очень чувствительных ИФА, ошибочно положительные результаты могут случаться по нескольким причинам, большинство из которых относятся, но не ограничиваются, к несоответствию промывочного этапа.
- Любые положительные результаты должны подтверждаться другим доступным методом. Любые положительные результаты должны интерпретироваться с историей пациента и другими клиническими и лабораторными данными.
- Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывки, загрязненные реагенты, неправильные этапы процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Преобладание маркера влияет на предположительные значения анализа.
- Ошибочно отрицательные результаты могут возникать от подавления специфического IgM при присутствии высокого титра специфического IgG. Удаление IgG могут быть полезными для предотвращения ошибочно отрицательных результатов.
- Это набор предназначен ТОЛЬКО для анализа отдельно взятых образцов сыворотки или плазмы. Не использовать для анализа трупных образцов, слюны, мочи или других биожидкостей или собранной (смешанной) крови.
- Это количественный анализ и результаты и результаты не могут быть использованы для измерения концентраций антител.

### ПРИЗНАКИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ

- Значения положительного или отрицательного контролей, находящиеся вне указанного диапазона контроля качества, являются указателями возможного ухудшения реагентов и/или качества работы оператора или сбоев оборудования. В таком случае результаты должны считаться недействительными и образцы должны повторно анализироваться. В случае постоянно ошибочных результатов исходя из ухудшения или нестабильности реагентов, немедленно замените реагенты другими.
- Если после смешивания растворов хромогена А и В в лунках цвет этой смеси в течении нескольких минут становится синим, не продолжайте проведения анализа и замените реагенты свежими.

### ГОДНОСТЬ

Не использовать набор по истечении 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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)