

# **HBsAg サブタイプ EIA**

モノクローナル抗体による HBs 抗原のサブタイプ判定用キット

24 テスト用

## **添付文書**

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用してください。

本試薬は、研究用試薬ですので臨床診断には使用できません。

## 【キットの構成】

1. HBs 抗体固相プレート (8 ウェル×12) (HBs マウスモノクローナル抗体)	1 枚
2. 陰性コントロール	1.0 mL × 1 本
3. 陽性コントロール d	0.5 mL × 1 本
4. 陽性コントロール y	0.5 mL × 1 本
5. 陽性コントロール r	0.5 mL × 1 本
6. 陽性コントロール w	0.5 mL × 1 本
7. 酵素標識抗体 d (ペルオキシダーゼ標識抗 d マウスモノクローナル抗体)	1.5 mL × 1 本
8. 酵素標識抗体 y (ペルオキシダーゼ標識抗 y マウスモノクローナル抗体)	1.5 mL × 1 本
9. 酵素標識抗体 r (ペルオキシダーゼ標識抗 r マウスモノクローナル抗体)	1.5 mL × 1 本
10. 酵素標識抗体 w (ペルオキシダーゼ標識抗 w マウスモノクローナル抗体)	1.5 mL × 1 本
** 1 1. 酵素基質 (TMB)	10 mL × 1 本
1 2. 反応停止液	10 mL × 1 本
1 3. 洗浄原液 (20 倍濃縮液)	25 mL × 2 本
1 4. プレートシール	5 枚

## 【使用目的】

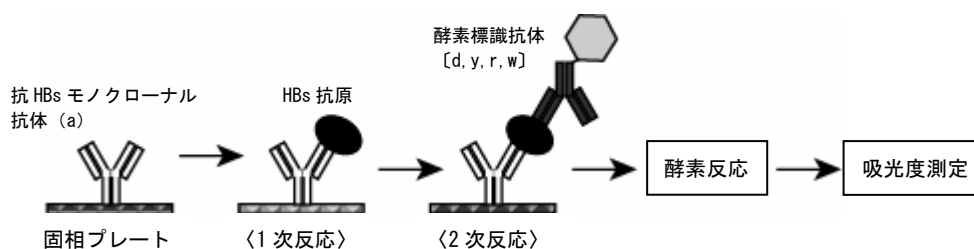
血清又は血漿中の HBs 抗原のサブタイプ (adr、adw、ayr、ayw 等) を判定する。

## 【測定原理】

HBs 抗原には全てのサブタイプに共通の抗原決定基 a とサブタイプに特異的な 2 組の相反する抗原決定基 d と y 及び r と w が存在します。

酵素免疫測定法 (EIA) を応用した本検出系は、二段階の抗原抗体反応と酵素呈色反応とからなります。第 1 次抗原抗体反応は、プレートに固相された共通抗原決定基 a に対するモノクローナル抗体 (抗 a マウスモノクローナル抗体) と、被検検体中の HBs 抗原との間で起こります。第 2 次抗原抗体反応は、固相抗体に結合した HBs 抗原と酵素標識されたサブタイプに特異的な 4 種類の抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗 d、抗 y、抗 r、抗 w マウスモノクローナル抗体) との間で起こります。

検体中の HBs 抗原サブタイプに対応して通常は 2 種類の酵素標識抗体が反応し、その後酵素反応により発色します。



## 【操作方法】

## 1. 試薬の調製方法

## (1) 洗浄液

洗浄原液を精製水で 20 倍に希釈してください。

使用後は 2～10℃に保存してください。

## 2. 必要な器具・器材

(1) マイクロピペット 50 μL、100 μL

(2) メスシリンダー 500 mL

(3) アスピレーター及びポリ洗浄瓶またはマイクロプレートウォッシャー

(4) インキュベーター (37±1℃)

(5) 暗所 (暗い戸棚または引き出しでも可)

\*\* (6) マイクロプレートリーダー (主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上)

## 3. 測定操作方法

キットの各試薬は使用前に必ず 15～30℃に戻してください。

## (1) 陰性、陽性コントロール及び検体の添加

ブランク用ウェルを残し、各ウェルに陰性、陽性コントロール及び検体を 50 μL ずつ入れてください。

プレートの代表的な使用 (検体割付) 例を下図に示します。

<注意>

プレートは着脱式で 12 分割が可能です。必要数を使用し未使用のものは乾燥剤と共にアルミ袋に密封し 2～10℃に保存してください。

## 検体割付例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	B	B	B	6	6	6	6	14	14	14	14	B: ブランク
B	N	N	N	N	7	7	7	7	15	15	15	15	N: 陰性コントロール
C	P-d	P-y	P-r	P-w	8	8	8	8	16	16	16	16	1~21: 検体
D	1	1	1	1	9	9	9	9	17	17	17	17	P-d: 陽性コントロールd
E	2	2	2	2	10	10	10	10	18	18	18	18	P-y: 陽性コントロールy
F	3	3	3	3	11	11	11	11	19	19	19	19	P-r: 陽性コントロールr
G	4	4	4	4	12	12	12	12	20	20	20	20	P-w: 陽性コントロールw
H	5	5	5	5	13	13	13	13	21	21	21	21	
	抗 原 決 定 基 の 検 出	抗 原 決 定 基 の 検 出	抗 原 決 定 基 の 検 出	抗 原 決 定 基 の 検 出	抗 原 決 定 基 d	抗 原 決 定 基 y	抗 原 決 定 基 r	抗 原 決 定 基 w	抗 原 決 定 基 d	抗 原 決 定 基 y	抗 原 決 定 基 r	抗 原 決 定 基 w	

## (2) 1次反応

検体が蒸発しないようにプレートシールを貼り、37℃で 3 時間又は 15～30℃で 16～24 時間静置してください。(15～30℃で 16～24 時間静置の方が幾分高い測定値を示します。)

## (3) 洗淨

プレートシールをはがし、ウェル内容物をアスピレーターで吸引除去してください。ポリ洗淨瓶を用いて、プレートの各ウェルを1. 試薬の調製方法(1)で調製した洗淨液で満たし、プレートを逆さまにして洗淨液を振り流します。この洗淨操作を5回繰り返してください。最後に、清潔なペーパータオル上でプレートを逆さまにして叩き、ウェルから洗淨液を除いてください。

## &lt;注意&gt;

洗淨操作中、プレート表面が乾燥しないように注意し、洗淨終了後、迅速に次の操作を行ってください。

## (4) 酵素標識抗体の添加

抗原決定基 d、y、r、w をそれぞれ検出する為のウェルに対応させて、酵素標識抗体 d を 50  $\mu$ L、酵素標識抗体 y を 50  $\mu$ L、酵素標識抗体 r を 50  $\mu$ L、酵素標識抗体 w を 50  $\mu$ L 添加してください。但し、ブランク用ウェルには添加しないでください。

## (5) 2次反応

プレートシールを貼り、37°Cで2時間静置してください。

## (6) 洗淨

(3)と同じ手順でプレートを洗淨してください。

## (7) 酵素基質の添加

酵素基質を全ウェルに100  $\mu$ Lずつ加えてください。

## \*\* (8) 酵素反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレートを暗所に入れて、15~30°Cで30分間静置してください。

## (9) 反応停止液の添加

プレートシールをはがし、反応停止液を全ウェルに100  $\mu$ Lずつ加えてよく混合してください。

## \*\* (10) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダー(主波長450 nm、副波長620 nm以上)で各ウェルの吸光度を測定してください。

## &lt;注意&gt;

0点調整はブランク用ウェルを用いて行ってください。

反応停止後、30分以内に測定してください。

**【測定結果の判定方法】**

## 1. 判定に関する注意事項

- (1) 検体中の HBs 抗原が高力価である場合にはサブタイプの抗原決定基を比較的容易に検出することができますが、低力価の場合には検出困難なこともあります。

- (2) 一般的に抗原決定基 d と y の一方及び r と w の一方がそれぞれ陽性になります。(サブタイプ ady、adw、ayr、ayw のいずれかに対応します。) しかし、d、y、r、w の 3 種類以上が陽性となることもまれにあります。

## 2. 判定基準

### (1) 各抗原決定基の判定

#### ① カットオフ値の算出

カットオフ値 = 各陰性コントロールの吸光度 + 0.2

#### ② 陰性・陽性の判定

陰性：検体の吸光度 < カットオフ値

陽性：検体の吸光度  $\geq$  カットオフ値

### (2) サブタイプの判定

- ① 抗原決定基 d と y 及び r と w のそれぞれ一方が陽性の場合、その抗原決定基に対応するサブタイプとして判定してください。

(例；「d: +」、 「y: -」、 「r: +」、 「w: -」 → サブタイプ adr)

- ② 抗原決定基 d、y、r、w の 3 種類以上が陽性の場合、一般には d 対 y、r 対 w の各反応性を比較し優位な方を採用しますが反応性が拮抗する場合は両方を採用してください。

## \*【使用上又は取り扱い上の注意事項】

本添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用目的及び操作方法以外での使用につきましては測定結果の信頼性を保証しかねます。

### 1. 一般的注意

(1) 使用する機器の添付文書及び取り扱い説明書をよく読んでから使用してください。

\*\* (2) 誤って試薬を凍結させた場合には、正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。

(3) キットの試薬は使用前に必ず 15~30°C に戻してください。

(4) ロット番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。また、プレートの再利用は避けてください。

(5) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

(6) 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。

(7) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用してください。

(8) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替えてください。

### \*\* 2. 操作上の注意

(1) ブランク、陰性コントロール及び陽性コントロール用ウェルは測定ごとに設けてください。

(2) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行ってください。

(3) 酵素反応停止後、30 分以内に吸光度を測定してください。

(4) 操作中、プレートを強くこすったり、底面に触れたりしないでください。また、プレート内面が乾燥しないように注意してください。

### 3. 取り扱い上の注意

- \*\* (1) 試薬は皮膚や粘膜に接触させないように注意してください。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流してください。必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (2) 検体は HBV、HCV、HIV などによる感染の危険性があるものとして取り扱ってください。また、陽性コントロール、陰性コントロールは HIV 抗体陰性を確認していますが、検体同様 HBV、HCV、HIV などによる感染の危険性があるものとして取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるために使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングは行わないでください。
- (3) 使用後の検体、試薬及び検体に使用した器具類は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。
- ① 0.05%ホルマリン溶液に 37℃、72 時間以上浸す。
  - ② 2 vol%グルタルアルデヒド溶液に 1 時間以上浸す。
  - ③ 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (0.1%以上) に 1 時間以上浸す。
  - ④ 121℃、20 分以上オートクレーブにかける。
- (4) 陽性コントロール及び陰性コントロールの廃棄についてはアジ化ナトリウムが添加されているので、爆発性の金属アジドが発生しないように充分注意して多量の水で流してください。

### 4. その他

- (1) キット中の容器、付属品は他の目的に使用しないでください。
- (2) 本試薬は研究用試薬ですので臨床診断の目的には使用しないでください。

#### 【貯法及び有効期間】

2～10℃で保存（凍結禁止）

製造後 1 年間有効（包装に表示の使用期限内に使用してください。）

#### 【包装単位】

1 キット：24 テスト用      CODE：1A63

#### 【主要文献】

Usuda S, Tsuda F, et al: A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic antigen determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies.

J Immunol Methods 87 : 203, 1986

#### 【お問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部

東京都文京区後楽 1-1-10

TEL 03-3814-4081      FAX 03-3814-5957

## 〈測定手順〉

測定項目 測定手順	ブランク	抗原決定基 d			抗原決定基 y			抗原決定基 r			抗原決定基 w		
		NC	PC	検体	NC	PC	検体	NC	PC	検体	NC	PC	検体
〈コントロール及び検体の添加〉													
陰性コントロール	—	50 µL	—	—	50 µL	—	—	50 µL	—	—	50 µL	—	—
陽性コントロール d	—	—	50 µL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
陽性コントロール y	—	—	—	—	—	50 µL	—	—	—	—	—	—	—
陽性コントロール r	—	—	—	—	—	—	—	—	50 µL	—	—	—	—
陽性コントロール w	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50 µL	—
検体	—	—	—	50 µL	—	—	50 µL	—	—	50 µL	—	—	50 µL
〈 1 次 反 応 〉	37℃、3時間、又は 15℃～30℃ 16～24時間												
〈 洗 浄 〉	5回繰り返し												
〈酵素標識抗体の添加〉													
酵素標識抗体 d	—	50 µL	50 µL	50 µL	—	—	—	—	—	—	—	—	—
酵素標識抗体 y	—	—	—	—	50 µL	50 µL	50 µL	—	—	—	—	—	—
酵素標識抗体 r	—	—	—	—	—	—	—	50 µL	50 µL	50 µL	—	—	—
酵素標識抗体 w	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	50 µL	50 µL	50 µL
〈 2 次 反 応 〉	37℃、2時間												
〈 洗 浄 〉	5回繰り返し												
〈酵素基質の添加〉	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
〈 酵 素 反 応 〉	15℃～30℃、暗所、30分												
〈反応停止液の添加〉	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
〈吸光度の測定〉	吸光度測定（主波長 450 nm、副波長 620 nm 以上）												

NC:陰性コントロール

PC:陽性コントロール

