



Vitrotest®

Vitrotest HBcore-IgM

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл класу IgM до корового антигену вірусу гепатиту В

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Розведення зразків та підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK019

«Vitrotest HBcore-IgM»
Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл класу IgM до корового антигену вірусу гепатиту В

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HBcore-IgM» призначена для виявлення антитіл класу IgM до корового антигену вірусу гепатиту В у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. Клінічне значення

При клінічному лабораторному аналізі різних форм вірусного гепатиту В виявляють низку серологічних маркерів цієї хвороби – структурні антигени вірусу (HBs-антиген та HBe-антиген), а також специфічні антитіла класу IgM та IgG до HBcore антигену та антитіла класу IgG до HBs- та HBe-антигенів.

Анти-HBcore антитіла класу IgM є маркерами активної вірусної реплікації і свідченням гострої фази гепатиту В (максимально – в період жовтяниці). Антитіла класу IgG до HBcore з'являються після анти-HBcore IgM антитіл або одночасно з ними. Якщо анти-HBcore IgM досягають максимальних значень через 2-3 місяці з моменту визначення HBsAg, то специфічні IgG досягають максимальних титрів через 5-6 місяців після появи HBsAg і циркулюють протягом життя в досить високих титрах.

Нерідко спостерігається фаза вікна, коли в крові не виявляються HBsAg та анти-HBs, в цей період єдиним маркером інфекції є анти-HBcore антитіла обох класів.

3. Принцип аналізу

Виявлення антитіл класу IgM до корового антигену вірусу гепатиту В в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM» ґрунтується на принципі «IgM-захвату» твердофазного імуноферментного аналізу.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках моноклональними антитілами, специфічними до імуноглобулінів класу IgM людини. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування імуноглобулінів класу IgM з моноклональними антитілами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається розчин кон'югату рекомбінантного HBcore антигену з пероксидазою хрому, що зв'язується з анти-HBcore специфічними імуноглобулінами класу IgM на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках, де утворились імуні комплекси, забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими моноклональними антитілами специфічними до імуноглобулінів класу М людини.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів класу IgM людини зшитих з моноклональними антитілами, специфічними до пероксидази хрому (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,5 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Розчин для промивання Tw20 (20X) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Твіном-20 (безбарвний).

Розчин для розведення сироваток PPC – 1 флакон, що містить 20 мл буферного розчину з детергентом та консервантом (фіолетовий).

Розчин для розведення кон'югату PPK – 1 флакон, що містить 14 мл буферного розчину з детергентом та консервантом (жовтий).

Кон'югат (11x) – 1 мікропробірка, що містить 1,4 мл 11-ти кратного концентрату кон'югату рекомбінантного HBcore антигену, з пероксидазою хрому у буферному розчині зі стабілізаторами (синій).

Розчин ТМБ – 1 флакон, що містить 12 мл розчину ТМБ і перекису водню з стабілізатором та консервантом (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації.

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та наконечники до них;
- термостат на 37°C;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2}Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

- не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;
- не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;
- *Примітка: Розчин для промивання Tw20 (20x), Розчин ТМБ, стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек“. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.*
- після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;
- чітко дотримуйтесь режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;
- під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;
- розчин ТМБ перед використанням має бути безбарвним або світло блакитним, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- для внесення в лунки планшета ТМБ-субстрату використовуйте лише нові наконечники, що не були у використанні;
- ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

- всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;
- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- в контрольних зразках тест-системи «Vitrotest HBcore-IgM» не виявлено HBsAg та антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак поводитись із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;
- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6% упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;
- не автоклавуйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6%-м перекисом водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером;

6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8°C.

Транспортувати набір при температурі 2-8°C. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20°C протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70°C. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Розведення зразків та підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest HBcore-IgM» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розведення зразків та контролів

Досліджувані зразки та контролі попередньо розведіть у 20 раз розчином для розведення сироваток. Наприклад, до 190 мкл розчину для розведення додайте 10 мкл сироваток або контролів та старанно перемішайте не допускаючи піноутворення.

Процедуру розведення зразків та контролів проводять безпосередньо перед аналізом.

Допускається розведення сироваток в 20 разів безпосередньо в лунках ІФА-планшета, при цьому для внесення зразків слід використовувати автоматичні дозатори високої точності з робочим об'ємом 2-20 або 0,5-10 мкл. В цьому разі в лунки ІФА-планшета внесіть по 95 мкл розчину для розведення сироваток та 5 мкл досліджуваних зразків або контролів та старанно перемішайте.

8.3. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37°C протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8°C не більше 7 діб.

8.4. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (жовтий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у зелений колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 1 мл розчину для розведення кон'югату 100 мкл концентрату кон'югату.

Розчин кон'югату в робочому розведенні стабільний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.3.

9.4. Внести по 100 мкл попередньо розведених 1:20 контролів: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунку В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок внести по 100 мкл попередньо розведених 1:20 досліджуваних зразків.

9.5. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.6. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

- видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;
- наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 15 секунд;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;
- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.7. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.4.

9.8. В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин при 37°C.

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.6.

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25°C.

9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки стрипів по 100 мкл стоп-реагенту, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні розчину ТМБ.

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 0,8 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ кожного значення негативного контролю не вище 0,15 ОО,

10.2. Облік результатів аналізу.

Розрахувати середнє значення негативного контролю

$$ОГ K_{\text{середнє}} = (ОГ K_{-1} + ОГ K_{-2} + ОГ K_{-3})/3.$$

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,3, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,3.$$

Для кожного досліджуваного зразка розрахувати індекс позитивності (ІП)

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{Граничне значення}.$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Зразки із значення індексу позитивності вище 1,1 є **позитивними** в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM».

Негативними є досліджувані сироватки із значенням ІП нижче 0,9.

Досліджувані зразки із значенням ІП в межах 0,9-1,1 вважати **невизначеними**, такі сироватки рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи, якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести тестування повторно отриманого через 2-4 тижні зразка сироватки. У разі одержання невизначених результатів такі зразки вважати негативними.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість тест-системи «Vitrotest HBcore-IgM» оцінювали за допомогою комерційної панелі сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences“ (США) «Anti-HBc Mixed Titer Performance Panel PHG202», що складається з 11 охарактеризованих зразків сироваток та плазми. Три сироватки, що містять анти-HBcore антитіла класу IgM відповідно до паспортних даних, у тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM» виявлені позитивними.

При дослідженні 15 сироваток крові отриманих від хворих на гепатит В, що містять антитіла класу IgM до HBcore-антигену (підтверджено в комерційній тест-системі, яка має CE-маркування), всі сироватки були виявлені позитивними в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM».

Специфічність тест-системи «Vitrotest HBcore-IgM» при тестуванні на 209 сироватках крові донорів та вагітних жінок становила 99,5 %.

11.2. Точність

Відтворюваність результатів в межах однієї постановки аналізу (Intra assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох позитивних сироваток з різним рівнем анти-НВcore IgM антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем, CV₁ та CV₂, відповідно.

№ сироватки	ІП середній	CV ₁ , %	CV ₂ , %
S78 +	1,78	8,2	7,3
S35 +	5,21	4,7	5,2

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем анти-НВcore IgM антитіл оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ІП середній	CV, %
S78 +	1,63	9,3
S35 +	5,26	6,8

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM до корового антигену вірусу гепатиту В.

Негативний результат в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM» показує, що тестований зразок не містить анти-НВcore IgM антитіл, або їх концентрація нижче рівня чутливості аналізу.

Література

1. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // Інфекційні та паразитарні хвороби: В 3 т. – К.: "Здоров'я", 2001. т.1. – С.601-614.
2. Дзюблик І.В. Парентеральні вірусні гепатити: Навчальний посібник. – Київ, 2005 – 168 с.
3. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // Clinical Microbiology Review. – 1999. – Vol.12, № 2. – P. 351-366.
4. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // Clin. Lab. – 2001. – V. 47, N. 1-2. – P. 51-55.
5. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // Postgrad. Med. J. – 2001. – V. 77. – P. 498-505.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл., вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25 С

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tw20* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

Розвести досліджувані зразки та контролі розчином для розведення сироваток (1:20). Наприклад, 190 мкл розчину + 10 мкл зразків

Внести по 100 мкл розведених контролів та зразків в лунки:
A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,
E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

Розвести концентрат кон'югату (11×) (синій) розчином для розведення кон'югату (жовтий) 1:11 (тобто, 1+10). Наприклад, 100 мкл кон'югату + 1000 мкл розчину (розчин забарвлюється в зелений колір)

В лунки стрипів внести по 100 мкл розведеного кон'югату

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 30 хв. при 37°C

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темряві при кімнатній температурі (18-25°C)

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густину в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgM» за формулою
$$ГЗ = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,3.$$

Розрахувати індекс позитивності (ІП) для досліджуваних зразків:

$$ІП = \frac{ОГ \text{ досліджуваного зразка}}{\text{граничне значення}}$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення ІП	Результат
$ІП_{\text{зразка}} > 1,1$	позитивний
$0,9 \leq ІП_{\text{зразка}} \leq 1,1$	невизначений
$ІП_{\text{зразка}} < 0,9$	негативний