



Vitrotest®

Vitrotest Anti-HBs

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до поверхневого 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. 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

TK020

«Vitrotest Anti-HBs»
Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest Anti-HBs» призначена для виявлення антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В у сироватці чи плазмі крові людини.

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 до HBe- та HBs-антигенів.

Антитіла до HBsAg у хворих на гострий гепатит В виявляються в крові після зникнення HBsAg. Поява цих антитіл у сироватці крові обстежуваної особи свідчить про закінчення інфекційного процесу. Період «вікна» (після зникнення HBsAg до появи анти-HBs) коливається від 3 місяців до року. При хронічному перебігу гепатиту В у частини хворих антитіла проти HBsAg можуть виявлятися одночасно з цим антигеном. Виявлення даних антитіл, особливо при наявності також антитіл проти HBeAg – надійний критерій розвитку постінфекційного імунітету.

Анти-HBs можна вважати ознакою перенесеного гепатиту В або проведеної вакцинації. Визначення рівня цих антитіл дає змогу оцінити рівень протективного імунітету до вірусу гепатиту В, що є найбільш інформативним критерієм ефективності вакцинації.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В в тест-системі «Vitrotest Anti-HBs» базується на принципі «сендвіч» варіанту твердофазного ІФА.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованим в лунках очищеним поверхневим антигеном вірусу гепатиту В. До складу кон'югату входять рекомбінантні білки – аналоги HBsAg субтипів ad та ay зшиті з пероксидазою хрому. Під час інкубації досліджуваних зразків антитіла, специфічні до HBsAg, зв'язуються як з HBsAg на твердій фазі так і з HBsAg в складі кон'югату утворюючи «сендвіч» антиген-антитіло-антиген. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання планшета. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ). В результаті реакції розчин в лунках де утворилися імунні 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 іммобілізованим очищеним інактивованим поверхневим антигеном вірусу гепатиту В.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 1 мл розчину моноклональних антитіл специфічних до HBsAg у фосфатному буфері з консервантами (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 1,8 мл негативної сироватки крові людини з консервантом (жовтий).

Кон'югат (11х) – 1 мікропробірка, що містить 0,7 мл 11-ти кратного концентрату кон'югату рекомбінантних HBs антигенів субтипів ad та ay з пероксидазою хрому у буферному розчині зі стабілізаторами (синій).

Розчин для розведення кон'югату – 1 флакон, що містить 7 мл буферного розчину з білками сироватки крові КРС, детергентом та консервантом (рожевий).

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

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

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

Клейка плівка – 2 аркуша 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 терміну 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: Допускається використання Розчину для промивання Tw20 (20x), Розчину ТМБ та Стоп-реагенту 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 має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням. 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;

– контролі тест-системи «Vitrotest Anti-HBs» не містять HBsAg та антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак, працювати 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, чи іншими дезінфікуючими агентами;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121°C упродовж 1 години;

– не автоклавайте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту зі слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти (наприклад, сироваток), обробити поверхню 6%-м розчином перекису водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером;

6. Зберігання та стабільність

Реактиви тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, за умови їх зберігання 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. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest Anti-HBs» 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. 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.

8.3. Розчин кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується наступним чином:

Розведіть концентрат кон'югату 11х (синій) у чистому флаконі розчином для розведення кон'югату (рожевий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у фіолетовий колір. Наприклад, для 8 лунок аналізу достатньо додати до 500 мкл розчину для розведення кон'югату 50 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 8.2.

9.4. Внести по 50 мкл контролів: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок внести по 50 мкл досліджуваних зразків.

9.5. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.6. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в лунки по 50 мкл розчину кон'югату. Для запобігання кросконтамінації зразків кон'югат слід вносити не торкаючись сироваток в лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш в лунках.

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 хвилин при температурі 37°C.

9.8. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки шість 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 30

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 п'ять разів;

– після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

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-субстрату.

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:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

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

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

– оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ К-) не вище 0,15 ОО,

– оптична густина кожного значення негативного контролю відрізняється не більше ніж в два рази від середнього значення негативного контролю, тобто

$$\text{ОГ К-}_{\text{середнє}} \times 0,5 \leq \text{ОГ К-}_{\text{л}} \leq \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} \times 2,0$$

Якщо одне зі значень негативного контролю виходить за межі цього інтервалу, його відкидають і розраховують середнє значення К- за рештою значень негативного контролю.

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,200, тобто

$$\text{Граничне значення} = \text{ОГ К-}_{\text{середнє}} + 0,200$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Негативними є досліджувані сироватки із значенням ОГ нижче граничного значення.

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються **позитивними** в тест-системі «Vitretest Anti-HBs».

Досліджувані зразки із значенням ОГ в межах 10% нижче рівня граничного значення - «сірої зони» - рекомендується дослідити повторно в двох лунках тест-системи, якщо результати знову будуть в цих межах, вважати їх негативними.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість тест-системи «Vitretest Anti-HBs» оцінювали за допомогою комерційної панелі сироваток виробництва ВВІ (США) «Anti-HBc Mixed Titer Performance Panel PGH202(M)», що складається з 11 охарактеризованих зразків сироваток та плазми. До складу панелі PGH202(M) входять сім зразків, які містять антитіла специфічні до HBsAg – ці сироватки були виявлені позитивними в тест-системі «Vitretest Anti-HBs».

При дослідженні 27 зразків сироваток крові вакцинованих від гепатиту В осіб, в усіх зразках були визначені специфічні до HBsAg антитіла.

При тестуванні 315 зразків сироваток крові донорів та вагітних жінок було виявлено двадцять два позитивних на анти-HBsAg зразки, всі ці зразки було протестовано на наявність анти-HBs антитіл в іншій тест-системі, що має СЕ маркування – в усіх зразках підтверджено наявність антитіл до HBsAg.

11.2. Точність

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

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем анти-HBs специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ОГ середня	CV ₁ , %	CV ₂ , %
S32+	1,417	4,2	5,1
S21+	0,378	7,4	6,8

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	ОГ середня	CV, %
S32+	1,512	5,9
S21+	0,418	7,3

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest Anti-HBs» є свідченням наявності у пацієнта антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В.

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

Антитіла до поверхневого антигену вірусу гепатиту В є показником протективного імунітету.

Виявлення анти-HBs у пацієнта не є доказом наявності вірусу гепатиту В в організмі, ці антитіла виявляються при хронічному та перенесеному в анамнезі гепатиті В, а також у вакцинованих проти гепатиту В осіб. Щоб відрізнити ці стани рекомендується протестувати пацієнта на інші маркери гепатиту В.

Для оцінки рівня протективного імунітету рекомендується визначити концентрацію анти-HBs антитіл в сироватці крові із застосуванням комплексу калібраторів «Vitrotest Calibrators Anti-HBs», що стандартизовані проти міжнародного стандарту згідно рекомендацій ВООЗ.

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. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. С.-Птб.-1998.-391 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 Anti-HBs»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C

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 концентрат кон'югату (11×) (*синій*) розчином для розведення кон'югату 1:11 (*рожевий*). Наприклад, 50 мкл кон'югату + 500 мкл розчину (*розчин забарвлюється в фіолетовий колір*)

Внести по 50 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки:
A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,
E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Поверх контролів та досліджуваних зразків обережно внести в лунки по 50 мкл розчину кон'югату

Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 120 хв. при 37°C

Промити лунки 6 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 Anti-HBs» за формулою
$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,200$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення оптичної густини	Результат
$ОГ_{зразка} > ГЗ$	позитивний
$ОГ_{зразка} \leq ГЗ$	негативний