



Vitrotest[®]

Vitrotest Calibrators Anti-HBs

Комплект калібраторів для кількісного визначення 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

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK021

«Vitrotest Calibrators Anti-HBs»

Комплект калібраторів для кількісного визначення антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В

1. Призначення

Комплект калібраторів «Vitrotest Calibrators Anti-HBs» призначений для кількісного визначення концентрації антитіл, специфічних до поверхневого антигену вірусу гепатиту В, HBsAg, у сироватці чи плазмі крові людини.

Комплект використовується разом з імуноферментною тест-системою «Vitrotest Anti-HBs»

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-, HBs- та HBe-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

Кількісне визначення антитіл до поверхневого антигену вірусу гепатиту В базується на принципі «сендвіч» варіанту твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тест-системи «Vitrotest Anti-HBs» та набору калібраторів «Vitrotest Calibrators Anti-HBs».

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 та пероксидазного кон'югату в лунках планшета антитіла, специфічні до HBsAg, зв'язуються як з антигеном на твердій фазі так і з рекомбінантними антигенами в складі кон'югату з пероксидазою хрому утворюючи «сендвіч» з антигенів. 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 утворились 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.

Внутрішні калібратори комплексу «Vitrotest Calibrators Anti-HBs» стандартизовані за Першим Міжнародним Стандартом Anti-Hepatitis B Immunoglobulin – 1st Reference Preparation 1977 (WHO).

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

Калібратор K0 – 1 мікропробірка, що містить 1 мл негативної сироватки крові людини (жовтий).

Калібратор K10 – 1 мікропробірка, що містить 1 мл розчину специфічних до HBsAg імуноглобулінів у концентрації 10 мМО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (зелений).

Калібратор K50 – 1 мікропробірка, що містить 1 мл розчину специфічних до HBsAg імуноглобулінів у концентрації 50 мМО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (помаранчевий).

Калібратор K100 – 1 мікропробірка, що містить 1 мл розчину специфічних до HBsAg імуноглобулінів у концентрації 100 мМО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (червоний).

Калібратор K200 – 1 мікропробірка, що містить 1 мл розчину специфічних до HBsAg імуноглобулінів у концентрації 200 мМО/мл у фосфатному буфері із стабілізаторами та консервантами (фіолетовий).

Розчин для розведення сироваток – 1 флакон, що містить 20 мл фосфатного буферу з екстрактом молока, детергентом та консервантами (фіолетовий).

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

Бланк для калібрувального графіку – 1 аркуш для побудови калібрувального графіку.

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використанням.

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

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

– **Імуноферментна тест-система «Vitrotest Anti-HBs»;**

– 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 або 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 напіваавтоматичний 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 реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;
 - 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 реагенти 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 реагенти набору призначені лише для in vitro діагностики;
- постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;
- не піпетувати розчини ротом;
- калібратори тест-системи «Vitrotest Calibrators Anti-HBs» протестовано та знайдено негативним на HBsAg, та антитіла до ВІЛ 1/2, ВГС, Трепонема pallidum, однак поводитись із калібраторами 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 автоклауйте 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

Реагенти 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. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти комплексу калібраторів «Vitrotest Calibrators Anti-HBs» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

Комплект використовується разом з імуоферментною тест-системою «Vitrotest Anti-HBs», тому слід підготувати ІФА-планшет, розчин для промивання та розчин кон'югату згідно пунктів інструкції до тест-системи «Vitrotest Anti-HBs».

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу, вставити їх в рамку ІФА-планшета.

9.2. Заповнити Бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно інструкції до тест-системи «Vitrotest Anti-HBs»

9.4. Внести по 50 мкл калібраторів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – Калібратор 200, в лунку В1 – Калібратор 100, в лунку С1 – Калібратор 50, в лунку D1 – Калібратор 10, в лунку Е1 – Калібратор 0, в решту лунок внести по 50 мкл досліджуваних зразків.

Сироватки пацієнтів з очікуваною концентрацією специфічних антитіл вище калібратора К200 (200 мМО/мл) рекомендуємо дослідити в розведенні 1:10 (1+9), розведення слід приготувати на розчині для розведення сироваток, що входить до складу набору калібраторів «Vitrotest Calibrators Anti-HBs», для цього в лунку слід внести 45 мкл розчину для розведення сироваток та 5 мкл досліджуваної сироватки.

9.5. Приготувати розчин кон'югату згідно інструкції до тест-системи «Vitrotest Anti-HBs».

9.6. Поверх калібраторів 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.

9.9. «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.

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

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

9.12. 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) Калібратора К0 не вище 0,15 оптичних одиниць (ОО),

– ОГ Калібратора К10 не нижче 0,15 ОО,

– ОГ Калібратора К50 знаходиться в межах 0,4-1,0 ОО,

– ОГ Калібратора К100 знаходиться в межах 1,0 -1,8 ОО,

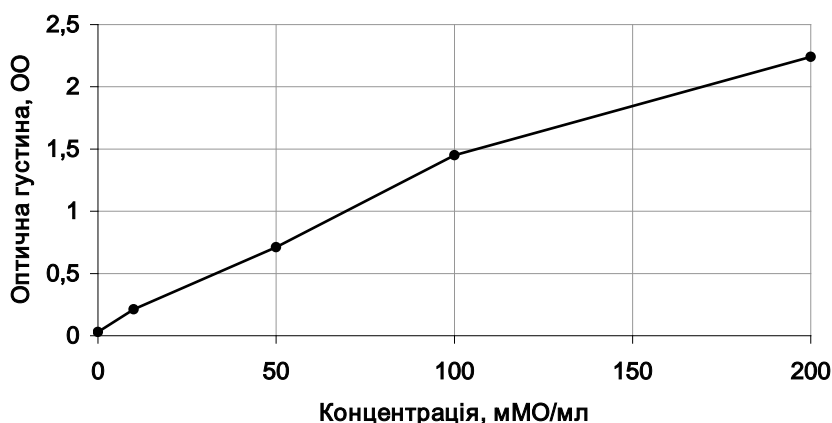
– ОГ Калібратора К200 не нижче 1,8 ОО

10.2. *Облік результатів аналізу.*

Для отримання кількісних результатів визначення концентрації специфічних до НВsAg антитіл в мМО/мл побудуйте калібрувальний графік: на осі ОУ відкладіть значення ОГ п'яти калібраторів К0, К10, К50, К100 та К200, а на осі ОХ – відповідні їм концентрації - 0, 10, 50, 100, 200 мМО/мл, відповідно.

За допомогою калібрувального графіку визначте концентрацію (мМО/мл) специфічних IgG у досліджуваних зразках, яка відповідає значенню отриманої ОГ.

Приклад калібрувального графіку наведено на рисунку.



Примітка:
Не використовуйте цей графік для визначення концентрації специфічних антитіл у Вашому аналізі.

Для зразків, що досліджувались у розведенні 1:10 визначену за графіком концентрацію специфічних антитіл слід перемножити на ступінь розведення, тобто

$$\text{кінцева концентрація} = \text{концентрація за графіком} \times 10$$

Для зручності обліку результатів реакції можна використовувати комп'ютерні програми зчитування та обрахунку результатів досліджень.

10.3. Інтерпретація результатів.

Результати визначення концентрації специфічних до HBsAg антитіл в мМО/мл інтерпретують наступним чином:

Концентрація	Результат
> 12 мМО/мл	позитивний
10-12 мМО/мл	невизначений
< 10 мМО/мл	негативний

Концентрація специфічних до HBsAg антитіл вище ніж 12 мМО/мл є показником перенесеного гепатиту В або проведеної вакцинації. Концентрація цих антитіл нижче 10 мМО/мл свідчить про відсутність протективного імунітету.

Література

1. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // В кн. "Інфекційні і паразитарні хвороби": в 3 т. - К.: "Здоров'я", 2001.т.1, 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