



Vitrotest[®]

Vitrotest HBcore-IgG

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл класу IgG 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. 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

TK050

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

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HBcore-IgG» призначена для виявлення антитіл класу IgG 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 ряд 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.

Антитіла до HBcore антигену – це найбільш ранній серологічний маркер гепатиту В, що може бути виявлений в інкубаційному періоді. Анти-HBcore IgM є маркером активної вірусної реплікації і свідченням гострої фази гепатиту В (максимально - в період жовтяниці). У фазу так званого «вікна» – після зникнення HBsAg і до появи антитіл проти нього – антитіла проти HBcore антигену стають єдиним маркером інфікування вірусом гепатиту В. Антитіла класу IgG до HBcore з'являються після HBcore IgM або одночасно з ними. Якщо анти-HBcore IgM досягають максимальних значень через 2-3 місяці з моменту визначення HBsAg, а потім, після завершення інфекційного процесу, зникають, то специфічні до HBcore IgG досягають максимальних титрів через 5-6 місяців після появи HBsAg і циркулюють протягом життя в досить високих титрах. Надалі (практично протягом всього життя) у всіх осіб, що були інфіковані вірусом гепатиту В, у крові можна виявити антитіла проти HBcore класу IgG.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgG до корового антигену вірусу гепатиту В в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgG» базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованим в лунках рекомбінантним HBcore антигеном вірусу гепатиту В. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до HBcore антигену антитіл з антигеном на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається пероксидазний кон'югат моноклональних антитіл до IgG людини, що зв'язується з імунними комплексами на твердій фазі. Не зв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імунних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену 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.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованим рекомбінантним HBcore антигеном.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,3 мл розчину імуноглобулінів людини, специфічних до HBcore-антигену (рожевий).

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

Розчин для розведення сироваток РРС – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину з екстрактом молока, детергентом та консервантами (коричнево-зелений).

Розчин кон'югату РК – 1 флакон, що містить 12 мл буферного розчину кон'югату моноклональних антитіл до IgG людини з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (зелений). Готовий до використання.

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

Розчин для промивання Тw20 (20x) – 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 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 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;

– позитивним контролем тест-системи «Vitrotest HBcore-IgG» є розчин імуноглобулінів людини, специфічних до корового антигену вірусу гепатиту В, які були виділені з інактивованої прогріванням сироватки крові людини, в якій не було виявлено HBsAg та антитіл до ВІЛ 1/2, вірусу гепатиту С, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролем слід як із потенційно інфекційним матеріалом;

– негативний контроль тест-системи «Vitrotest HBcore-IgG» протестовано та знайдено негативним на антитіла до ВІЛ1/2, ВГС, *Treponema pallidum* та HBsAg, 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 °С. 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 HBcore-IgG» 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.

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 в усі лунки планшета по 80 мкл розчину для розведення сироваток.

9.5. Внести в лунки по 20 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на блакитний.

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

9.7. 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 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 чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

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

9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в пункті 9.7.

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 °С.

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:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

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

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

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

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

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

$$ОГ K_{-середнє} \times 0,5 \leq ОГ K_{-n} \leq ОГ K_{-середнє} \times 2,0.$$

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

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,20, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,20.$$

10.3. Інтерпретація результатів

Зразки із значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються **негативними** в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgG».

Зразки зі значенням оптичної густини в межах 10% нижче граничного значення вважаються **невизначеними** (рекомендується повторно дослідити такі сироватки в двох лунках тест-системи).

Зразки із значенням ОГ вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи «Vitrotest HBcore-IgG». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «Vitrotest HBcore-IgG» вважаються зразки, ОГ котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні ОГ зразка в обох повторах була нижче граничного значення таку сироватку вважати негативною.

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Специфічність та чутливість тест-системи «Vitrotest HBcore-IgG» 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. В тест-системі «Vitrotest HBcore-IgG» всі позитивні та негативні зразки визначались коректно, відповідно до паспортних даних.

При дослідженні 67 зразків сироваток крові, отриманих від хворих на хронічний та гострий гепатит В, в усіх зразках було виявлено антитіла до корового антигену вірусу гепатиту В тест-системою «Vitrotest HBcore-IgG». При тестуванні 217 зразків сироваток крові донорів було виявлено 37 позитивних на антитіла до HBcore антигену зразки. Ці сироватки були проаналізовані в іншій комерційній тест-системі на анти-HBcore, що має СЕ маркування і підтверджені позитивними.

11.2. Точність

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

Коефіцієнт варіації (CV) для двох позитивних сироваток з різним рівнем специфічних антитіл та однієї негативної сироватки оцінювали в 32 повторах на двох серіях тест-систем, CV₁ та CV₂, відповідно.

№ сироватки	ОП середнє	CV ₁ , %	CV ₂ , %
35 +	1,254	6,0	6,2
26 +	2,457	4,0	5,1

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл та однієї негативної сироватки оцінювали протягом трьох днів в трьох постановках аналізу, по 8 повторів в кожному аналізі.

№ сироватки	ОП середнє	CV, %
35 +	1,315	8,8
26 +	2,232	5,0

12. Обмеження аналізу

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

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

Антитіла класу IgG до корового антигену вірусу гепатиту В не є показником протективного імунітету.

Виявлення антитіл класу IgG до HBcore антигену у пацієнта не є доказом наявності вірусу гепатиту В в організмі, ці антитіла виявляються при гострому, хронічному та перенесеному в анамнезі гепатиті В. Щоб відрізнити ці стани рекомендується протестувати пацієнта на інші маркери гепатиту В.

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 HBcore-IgG»

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

В лунки планшета внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 20 мкл досліджуваних зразків та контролів в лунки:

A1 – позитивний контроль, B1, C1, D1 – негативний контроль,

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

Під час внесення сироваток відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій

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

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину кон'югату (зелений)

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

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

Інкубувати планшет 30 хв. в темноті при кімнатній температурі (18-25 °С)

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-IgG» за формулою

$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,20$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення оптичної густини

$$ОГ_{зразка} \geq ГЗ$$

$$0,9 \times ГЗ \leq ОГ_{зразка} < ГЗ$$

$$ОГ_{зразка} < ГЗ$$

Результат

позитивний

невизначений

негативний