



Vitrotest[®]

Vitrotest HBsAg

**Імуноферментна тест-система для виявлення
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

TK016

«Vitrotest HBsAg»

Імуноферментна тест-система для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HBsAg» призначена для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) 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.

HBsAg – основний маркер інфікування вірусом гепатиту В є структурним білком, що відповідає за адсорбцію вірусу на клітинах гепатоцитів. Це перший маркер, що з'являється в крові через 3-5 тижнів з моменту інфікування, до появи клінічних симптомів і при гострому гепатиті виявляється ще протягом кількох місяців у досить високих концентраціях. При сприятливому перебігу хвороби HBsAg зникає через 4-6 місяців після зараження. Якщо цього не відбувається, діагностують хронічний гепатит.

Концентрація HBsAg в сироватці крові хворих на вірусний гепатит В може коливатися в широкому діапазоні - від нанограмів до сотень мікрограмів на мл. Елімінація HBsAg з циркуляції вважається критерієм видужання.

Серед лабораторних методів визначення HBsAg найбільш поширеним та високочутливим є імуноферментний аналіз, що використовується як для діагностики захворювання так і для скринінгу донорської крові з метою попередження трансмісивної передачі гепатиту В.

3. Принцип аналізу

Принцип аналізу тест-системи Vitrotest HBsAg базується на одноетапному «сендвіч»-варіанті імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням пари моноклональних антитіл в складі імуносорбенту та пероксидазного кон'югату.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках першими моноклональними антитілами, специфічними до HBsAg. Другі моноклональні антитіла входять до складу пероксидазного кон'югату. Під час інкубації досліджуваних зразків та пероксидазного кон'югату в лунках планшета HBsAg зв'язується одночасно як з першими антитілами на твердій фазі, так і з другими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому – утворюючи «сендвіч» антитіло-антиген-антитіло. 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.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення кожної лунки), з іммобілізованими моноклональними антитілами до HBsAg.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 1,8 мл розчину поверхневого антигену вірусу гепатиту В у фосфатному буфері з альбуміном та консервантами (рожевий).

Негативний контроль – 2 мікропробірки, що містять по 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 моноклональних антитіл до HBsAg 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 великої рогатої худоби та імуноглобулінами миші (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 – 1 аркуш 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;
- термошейкер 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 „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;
- позитивний контроль тест-системи «Vitrotest HBsAg» містить очищений поверхневий антиген вірусу гепатиту В, що виділений з інактивованої прогріванням сироватки крові людини, в якій не виявлено антитіл до ВІЛ 1/2, ВГС, *Treponema pallidum*, однак працювати із контролем слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;
- негативний контроль тест-системи «Vitrotest HBsAg» 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 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. **Більш тривале зберігання зразків** допускається лише **замороженими** при температурі від -20 до -70°C.

Увага! Тривале зберігання (більше трьох діб) зразків сироваток чи плазми при температурі 2-8°C може спричинити хибнопозитивний результат аналізу.

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 HBsAg» 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. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.5. Внести в лунки по 100 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль, в лунку Е1 та решту лунок – досліджувані зразки.

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 і постійному орбітальному перемішуванні вмісту лунок** із швидкістю 300 об/хв.

Інкубацію сироваток з кон'югатом в лунках ІФА-планшета також можна проводити протягом 120 хвилин при температурі 42°C в статичному режимі. Однак, при цьому може спостерігатись зниження специфічності аналізу.

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 одновхвильовому 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

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

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

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

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 0,070, тобто

$$\text{Граничне значення} = ОГ K_{- \text{середнє}} + 0,07$$

10.3. Інтерпретація результатів.

Зразки із значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються **негативними** в тест-системі «Vitrotest HBsAg». Однак результати в межах 10% нижче граничного значення слід інтерпретувати з обережністю (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 HBsAg». Після повторного тестування **позитивними** в тест-системі «Vitrotest HBsAg» 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 HBsAg» оцінювали за допомогою комерційної панелі низькотитражних сироваток виробництва „SeraCare Life Sciences” (США) «HBsAg Low Titer Performance Panel PHA106(M)», що складається з 13 охарактеризованих зразків сироваток та плазми, одна з яких є негативною, а решта містить HBsAg у концентраціях від 0,05 до 0,6 МО/мл, всі сироватки, що містять антиген були виявлені позитивними, негативну сироватку виявлено негативною.

Межу чутливості аналізу щодо виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В визначали за допомогою панелі сироваток «Hepatitis B Surface Antigen Sensitivity Panel» виробництва „SeraCare Life Sciences” (США). Чутливість тесту щодо виявлення HBsAg ad та au субтипів на даній панелі становила 0,08 та 0,09 МО/мл, відповідно. При тестуванні на галузевому стандартному зразку «ОСО-HBsAg» (Росія) та на Британському стандартному зразку 07/288-010 для HBsAg (Національний інститут біологічних стандартів Об'єднаного королівства, NIBSC) межа чутливості тест-системи «Vitrotest HBsAg» була однаковою і складала 0,05 МО/мл.

При дослідженні 67 зразків сироваток крові хворих на хронічний та гострий гепатит В в усіх зразках було виявлено HBsAg тест-системою «Vitrotest HBsAg». При тестуванні 315 зразків сироваток крові донорів та вагітних жінок було виявлено три позитивні на HBsAg зразки, у двох з яких наявність HBsAg було підтверджено в тест-системі «Vitrotest HBsAg-Confirmation» та ще двох скринінгових ІФА, що мають СЕ маркування.

11.2. Точність

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

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

№ сироватки	ОГ середня	CV ₁ , %	CV ₂ , %
S115	0,352	5,2	4,8
S28	1,512	3,1	3,8

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	ОГ середня	CV, %
S115	0,412	9,3
S28	1,659	7,2

12. Обмеження аналізу

Негативний результат в тест-системі «Vitrotest HBsAg» показує, що тестований зразок не містить HBsAg, або його концентрація нижче 0,05 МО/мл.

Для перевірки достовірності позитивної реакції в тест-системі «Vitrotest HBsAg» рекомендується провести підтверджуючий аналіз в нейтралізаційному ІФА з використанням комплекту реагентів «Vitrotest HBsAg-Confirmation».

З метою нівелювання хибнопозитивних результатів, спричинених наявністю в зразках сироваток крові людини антитіл, специфічних до імуноглобулінів миші, в тест-системі використовується спеціальний блок-компонент, що перешкоджає формуванню імунних комплексів з анти-мишачими антитілами на твердій фазі.

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 HBsAg»

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 (*рожевий*) 1:11 (тобто, 1+10). Наприклад, 50 мкл кон'югату + 500 мкл розчину. (*розчин забарвлюється у фіолетовий колір*)

Внести по 100 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 42°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 HBsAg» за формулою

$$ГЗ = ОГ_{K-середнє} + 0,070$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення оптичної густини

ОГ зразка > ГЗ

ОГ зразка < ГЗ

Результат

позитивний

негативний