



**Vitrotest**®

# Vitrotest HBsAg-Confirmation

Комплект реагентів для підтвердження наявності  
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. Розведення зразків та підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK017

## «Vitrotest HBsAg-Confirmation»

### Комплект реагентів для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В

#### 1. Призначення

Комплект реагентів «Vitrotest HBsAg-Confirmation» призначений для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В HBsAg у сироватці чи плазмі крові людини. Комплект використовується разом з імуноферментною тест-системою «Vitrotest HBsAg»

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 HBe-антигену та антитіла класу IgG до HBs- та HBe-антигенів.

Поверхневий антиген вірусу гепатиту В (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, причому титри HBsAg коливаються в широких діапазонах - від низьких до порівняно високих. 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 трансфузійного гепатиту В (трансмисивної передачі гепатиту В).

#### 3. Принцип аналізу

Принцип аналізу тест-системи «Vitrotest HBsAg-Confirmation» базується на конкурентному одноетапному «сандвіч»-варіанті імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням моноклональних антитіл в складі імуносорбенту, пероксидазного кон'югату та нейтралізаційного компоненту.

Набір реагентів використовується разом з імуноферментною тест-системою для виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В «Vitrotest HBsAg». Твердою фазою в аналізі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках моноклональними антитілами, специфічними до HBsAg. Другі моноклональні антитіла входять до складу пероксидазного кон'югату. До складу нейтралізаційного компоненту входить суміш моноклональних антитіл, специфічних до HBsAg. Під час інкубації досліджуваних зразків та пероксидазного кон'югату в лунках планшета HBsAg зв'язується як з першими антитілами на твердій фазі, так і з другими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому, утворюючи «сандвіч» антитіло-антиген-антитіло. Такий «сандвіч» не утворюється в присутності нейтралізаційного компоненту – моноклональних антитіл, специфічних до HBsAg – відбувається нейтралізація HBsAg. Незв'язані компоненти потім 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, в лунках де відбулась нейтралізація HBsAg моноклональними антитілами забарвлення не розвивається. 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

**Нейтралізаційний компонент** – 1 мікропробірка, що містить 1 мл 11-ти кратного концентрату розчину моноклональних антитіл до HBsAg у трис-НСІ буфері зі стабілізаторами (зелений).

**Розчин для розведення сироваток** – 2 флакони, що містять по 50 мл фосфатного буферу з екстрактом молока, детергентом та консервантами (фіолетовий).

**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:

- **Імуноферментна тест-система «Vitrotest HBsAg» будь-якої комплектації**,
- 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;
  - термошейкер на 37°C або термостат на 42°C;
  - контейнер для твердих відходів;
  - контейнер для рідких відходів;
  - <sup>1</sup>автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
  - <sup>2</sup>одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.
- <sup>1,2</sup>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;
- комплект реагентів «Vitrotest HBsAg-Confirmation» не містить компонентів людського походження, однак працювати із набором слід дотримуючись правил безпечної роботи з 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) її освітлюють центрифугуванням 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 HBsAg-Confirmation» при кімнатній температурі 18-25°C протягом 30 хвилин перед використанням.

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

#### 8.1. Розведення зразків та контролів

Сироватки з високою концентрацією поверхневого антигену вірусу гепатиту В >10 мкг/мл (оптична густина в тест-системі «Vitrotest HBsAg» - вище 3,0 оптичних одиниць) можуть не нейтралізуватись в нерозведеному вигляді. Такі сироватки слід досліджувати цільними та розведеними в 100 разів розчином для розведення сироваток.

Розведення сироваток 1:100 готують наступним чином: до 990 мкл розчину для розведення сироваток додають 10 мкл сироватки, яка має високе значення ОГ в тест-системі «Vitrotest HBsAg».

Процедуру розведення зразків проводять безпосередньо перед аналізом.

#### 8.2. Приготування розчину нейтралізаційного компоненту

Розчин нейтралізаційного компоненту готується на основі розчину кон'югату у робочому розведенні з тест-системи «Vitrotest HBsAg».

Для приготування розчину нейтралізаційного компоненту розведіть концентрат нейтралізаційного компоненту (зелений) 1:11 розчином кон'югату у робочому розведенні (фіолетовий), та перемішайте.

Наприклад: для дослідження 8 зразків, позитивних на HBsAg у тест-системі «Vitrotest HBsAg», достатньо приготувати 1 мл розчину кон'югату, відібрати 0,5 мл цього розчину та додати до нього 50 мкл нейтралізаційного компоненту. Обережно перемішати розчин не допускаючи піноутворення.

Розчин кон'югату з нейтралізаційним компонентом має бути використаний протягом доби за умови зберігання при 2-8°C.

### 9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу, 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 інструкції до тест-системи «Vitrotest HBsAg».

9.4. Приготувати розчин кон'югату згідно інструкції до тест-системи «Vitrotest HBsAg».

9.5. Приготувати розчин кон'югату та нейтралізаційного компоненту згідно пункту 8.2.

9.6. При потребі приготувати попереднє розведення 1:100 досліджуваних сироваток з високим вмістом HBsAg згідно пункту 8.1.

9.7. Контрольні зразки та досліджувані сироватки цільні або в розведенні 1:100 внести по 100 мкл в двох повторях (для прямого та конкурентного ІФА) наступним чином: в лунки А1, А2 – позитивний контроль, в лунки В1, В2, С1, С2 – негативний контроль, в лунки D1, D2 та інші лунки – досліджувані зразки.

9.8. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в непарні стрипи (А1, В1, С1 і т.д.) по 50 мкл розчину кон'югату для проведення прямого ІФА, в парні стрипи (А2, В2, С2 і т.д.) по 50 мкл розчину кон'югату з нейтралізаційним компонентом для проведення конкурентного ІФА. Для запобігання кросконтамінації зразків, розчини кон'югату та нейтралізаційного компоненту слід вносити не торкаючись сироваток в лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш в лунках.

9.9. 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.

9.10. 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.

9.11. Внести в лунки стрипів по 100 мкл розчину ТМБ. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Для внесення розчину ТМБ використовувати лише нові наконечники.

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

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

9.14. Виміряти на рідері оптичну густина 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 % нейтралізації для лунок з позитивним контролем наступним чином:

$$\% \text{ нейтралізації } K+ = \frac{ОГ_{K+ \text{ прямого ІФА}} - ОГ_{K+ \text{ конкурентного ІФА}}}{ОГ_{K+ \text{ прямого ІФА}}} \times 100\%$$

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю в прямому ІФА не нижче 1,5 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ всіх лунок негативного контролю в прямому чи конкурентному ІФА не вище 0,15 ОО,
- % нейтралізації для позитивного контролю складає не менше 50%.

### 10.2. Облік результатів аналізу.

Розрахувати середнє значення негативного контролю в прямому ІФА

$$ОГ_{K- \text{ середнє}} = (ОГ_{K-1} + ОГ_{K-2}) / 2$$

Рівень граничного значення (ГЗ) розрахувати, додаючи до середнього значення негативного контролю в прямому ІФА величину 0,070, тобто

$$\text{граничне значення} = ОГ_{K- \text{ середнє}} + 0,07$$

Розрахувати % нейтралізації для досліджуваних зразків наступним чином:

$$\% \text{ нейтралізації} = \frac{ОГ_{\text{ зразка в прямому ІФА}} - ОГ_{\text{ зразка в конкурентному ІФА}}}{ОГ_{\text{ зразка в прямому ІФА}}} \times 100\%$$

### 10.3. Інтерпретація результатів.

Досліджувані сироватки із значенням ОГ в прямому ІФА нижче граничного значення є **негативними**.

Досліджувані сироватки (цільні або в розведенні 1:100) із значенням ОГ в прямому ІФА більше величини граничного значення, та % нейтралізації 50 і більше є **позитивними**.

Зразки, які при тестуванні цільними та розведеними в 100 разів мають ОГ в прямому ІФА більше 3,0 та не нейтралізувались, слід також дослідити в розведенні 1:1000 та провести інтерпретацію результатів, як вказано вище.

Якщо значення ОГ досліджуваних сироваток (цільних або в розведенні 1:100) в прямому ІФА більше граничного значення, а відсоток нейтралізації становить менше 50, то це вказує на неспецифічну реакцію. Такі зразки слід вважати **негативними**.

Тобто:

Значення оптичної густини	% нейтралізації	Результат
$ОГ_{\text{ зразка в прямому ІФА}} \geq ГЗ$	$\geq 50\%$	<b>позитивний</b>
$3,000 > ОГ_{\text{ зразка в прямому ІФА}} \geq ГЗ$	$< 50\%$	<b>негативний</b>
$ОГ_{\text{ зразка в прямому ІФА}} < ГЗ$	будь-який	<b>негативний</b>

## 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» з використанням комплекту реагентів «Vitrotest HBsAg-Confirmation»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25°C												
Приготувати розчин для промивання планшета, розвести концентрат (20x) очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19) Наприклад, 5 мл розчину + 95 мл води												
Заповнити бланк внесення проб для аналізу												
При потребі розвести досліджувані зразки 1:100 (якщо ОГ зразків у тест-системі «Vitrotest HBsAg» вище 3,000 ОО) розчином для розведення зразків												
Розвести концентрат кон'югату (11x) ( <i>синій</i> ) розчином для розведення кон'югату ( <i>рожевий</i> ) 1:11. Наприклад, 100 мкл кон'югату + 1000 мкл розчину ( <i>розчин забарвлюється у фіолетовий колір</i> )												
Приготувати розчин нейтралізаційного компоненту (11x): розвести нейтралізаційний компонент (11x) ( <i>зелений</i> ) розчином кон'югату у робочому розведенні ( <i>фіолетовий</i> ). Наприклад, 50 мкл нейтралізаційного компоненту + 500 мкл розчину кон'югату												
Внести по 100 мкл контролів та досліджуваних зразків в лунки: A1, A2 – позитивний контроль, B1, B2, C1, C2 – негативний контроль, D1, D2 – та решта лунок в тому ж порядку – цільні досліджувані зразки або в розведенні 1:100.												
Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки <i>неларних</i> стрипів внести по 50 мкл розчину кон'югату												
Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки <i>ларних</i> стрипів внести по 50 мкл розчину нейтралізаційного компоненту												
Заклеїти стрипи плівкою, інкубувати 120 хв. при температурі 37°C і постійному орбітальному перемішуванні вмісту лунок із швидкістю 300 об/хв												
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) за формулою $\text{граничне значення} = \text{ОГ}_{\text{К - середнє}} + 0,07$												
Розрахувати % нейтралізації для досліджуваних зразків за формулою: $\% \text{ нейтралізації} = \frac{\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} - \text{ОГ}_{\text{зразка в конкурентному ІФА}}}{\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}}} \times 100\%$												
Провести облік результатів аналізу згідно таблиці												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="padding: 5px;">Значення оптичної густини</th> <th style="padding: 5px;">% нейтралізації</th> <th style="padding: 5px;">Результат</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;"><math>\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}</math></td> <td style="padding: 5px;"><math>\geq 50\%</math></td> <td style="padding: 5px;"><b>позитивний</b></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><math>3,000 &gt; \text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}</math></td> <td style="padding: 5px;"><math>&lt; 50\%</math></td> <td style="padding: 5px;"><b>негативний</b></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"><math>\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} &lt; \text{ГЗ}</math></td> <td style="padding: 5px;">будь-який</td> <td style="padding: 5px;"><b>негативний</b></td> </tr> </tbody> </table>	Значення оптичної густини	% нейтралізації	Результат	$\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$\geq 50\%$	<b>позитивний</b>	$3,000 > \text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$< 50\%$	<b>негативний</b>	$\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} < \text{ГЗ}$	будь-який	<b>негативний</b>
Значення оптичної густини	% нейтралізації	Результат										
$\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$\geq 50\%$	<b>позитивний</b>										
$3,000 > \text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} \geq \text{ГЗ}$	$< 50\%$	<b>негативний</b>										
$\text{ОГ}_{\text{зразка в прямому ІФА}} < \text{ГЗ}$	будь-який	<b>негативний</b>										