



СЕРТИФІКАТ

CERTIFICATE * CERTIFICAT * ZERTIFIKAT * СЕРТИФИКАТ * CERTIFICADO

ОРГАН СЕРТИФІКАЦІЇ СИСТЕМ УПРАВЛІННЯ
ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»
ЗАСВІДЧУЄ, ЩО

СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ

ТОВАРИСТВА З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «ВІТРОТЕСТ БІОРЕАГЕНТ»

Юридична адреса: вул. Бойчука, 18-Б, кв. 56, м. Київ,
01103, Україна
Адреса виробництва: вул. Курортна, 11, м. Київ, 04075, Україна

код ЄДРПОУ 42149820

СТОСОВНО
розроблення та виробництва тест-систем імуноферментних

**ВІДПОВІДАЄ ВИМОГАМ
ДСТУ EN ISO 13485:2018
(EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT)**

Сертифікат № UA.C.378–19 в Реєстрі Органу сертифікації
zareєстрований " 25 " листопада 2019 року
чинний до " 24 " листопада 2022 року

Заступник керівника
Органу сертифікації



В.Д. Ример



ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО «ВСЬУКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ВИРОБНИЧИЙ ЦЕНТР
СТАНДАРТИЗАЦІЇ, МЕТРОЛОГІЇ, СЕРТИФІКАЦІЇ ТА ЗАХИСТУ ПРАВ СПОЖИВАЧІВ»
(ДП «УКРМЕТРТЕСТСТАНДАРТ»)

вул. Метрологічна, 4, м. Київ, 03143, Україна, тел./факс +38 044 452-67-38
Атестат акредитації НААУ № 80020

№ 80020
ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

Чинність сертифікату можна перевірити на сайті www.certsystems.kiev.ua в розділі
«Послуги / Сертифікація систем управління»

исх. № 16.02.2021/2
от 16.02.2021

Письмо об Авторизации

Настоящим письмом ООО «Витротест Биореагент», производитель иммуноферментных тест-систем под торговой маркой «Vitrotest®», подтверждает, что компания Sanmedico SRL является авторизованным дистрибьютором нашей компании на территории - Республики Молдова, обладающим правами по продаже продвижению и участию в тендерных торгах с нашей продукцией.

Директор ООО "Витротест Биореагент"



к.м.н Николаенко И.В.



Vitrotest® Anti-HBcore

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В

TK018
96 аналізів

IVD

1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Anti-HBcore призначена для виявлення антитіл до корового антигену вірусу гепатиту В у сироватці чи плазмі крові людини. Тест-набір може бути застосований як для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Вірус гепатиту В (ВГВ) є оболонковим вірусом родини *Hepadnaviridae*, що містить ДНК. Гепатит В (ІВ) має тривалий інкубаційний період 45-160 днів (в середньому 120 днів). Наявність симптомів при гострому ГВ зворотно корелює з віком: менш ніж 1% новонароджених та 30–50% дорослих мають симптоми ГВ. Особи з симптомами, які є загальними для всіх типів вірусного гепатиту, зазвичай страждають від втоми, втрати апетиту, неприємних відчуттів у шлунку, нудоти, блювоти, лихоманки та жовтухи. У менш ніж 1% випадків, особливо в осіб похилого віку, розвивається блискавичний гепатит, який у більшості випадків є смертельним внаслідок гострого некрозу печінки.

Гострий ГВ часто завершується спонтанно після 4-8-тижневої хвороби. В інших випадках захворювання триває 6 місяців або більше. Цей стан відомий як хронічний ГВ. Хронічна інфекція виникає більш ніж у 90% інфікованих новонароджених, 25–50% дітей, інфікованих у віці 1-5 років, і 6–10% дітей старших за 5 років та дорослих. У значного числа пацієнтів хронічний ГВ призводить до цирозу печінки та карциноми.

Перенесення вірусу відбувається внаслідок контакту пошкодженої шкіри та слизових оболонок з заразними рідинami організму, такими як кров, вагінальні та менструальні рідини, сім'я. Основні шляхи передачі включають: вертикальний – від інфікованої матері при пологах (рівень передачі близько 50%); статевий; горизонтальний – побутовий контакт з інфікованою особою (наприклад, контакт інфекційної крові з подряпинами на шкірі).

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 класів IgM та IgG до HBcore-антигену, антитіла класу IgG до HBs- та HBe-антигенів.

Першими серологічними маркерами, які спостерігаються у осіб з гострою ВГВ інфекцією, є HBsAg та антитіла до корового антигену ВГВ. Ці маркери з'являються під час інкубаційного періоду через 3-6 тижнів після інфікування. Антитіла IgG та IgM до HBcore з'являються пізніше та майже одночасно. У осіб, які одужують після ВГВ інфекції, HBsAg поступово елімінується з крові, і приблизно через 6 місяців після інфекції з'являються анти-HBs антитіла. Приблизно в той же час припиняють визначатися антитіла IgM до HBcore. Анти-HBcore IgG персистують протягом усього життя. Згідно з даними ВООЗ, наявність анти-HBs антитіл на рівні 10 mMO/ml і вище є надійним показником розвитку протективного імунітету.

Незважаючи на впровадження молекулярних методів, серологічні тести залишаються основною діагностикою ГВ. Біохімічні проби, особливо ті, що вимірюють підвищення активності сироваткових трансамінз (амінотрансфераз), можуть надавати допоміжну інформацію. Відповідно до визначення ВООЗ, діагноз ГВ вважається підтвердженням, якщо тести на HBsAg або anti-HBcore IgM – позитивні, а тести на anti-HAV IgM – негативні.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення специфічних до корового антигену вірусу гепатиту В антитіл у тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА у двоетапній інкубації. У лунках планшету засорбовано рекомбінантний HBcore антиген вірусу гепатиту В. На першому етапі під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування, за наявності у зразках, специфічних до HBcore антигену антитіл з антигенами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів у лунки додається кон'югат антивидових анти-IgG та анти-IgM моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси антиген-антитіло виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 30 min інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту і оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрії при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразка, дозволяє виявити наявність або відсутність антитіл до HBcore антигена. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл, зв'язаних з антигенами на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	1x96 лунок	ІФА-планшет У кожній лунці планшета засорбовано рекомбінантний HBeAg антиген вірусу гепатиту В. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,5 ml	Позитивний контроль Розчин специфічних імуноглобулінів з консервантом (рожевий).
CONTROL -	1x1,0 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
SAMPLE DILUENT	1x10 ml	Розчин для розведення сироваток Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).
CONJUGATE SOLUTION	1x12 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgG та IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, із стабілізаторами та консервантом (зелений), готовий до використання.
TMB SOLUTION	1x12 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x50 ml	Розчин для промивання Tw20 (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x12 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (2), бланк внесення проб (1) та інструкція з використання.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- Автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 μ l та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10-1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 37 $^{\circ}$ C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

Примітка: допускається використання WASH TWEEN 20X, TMB SOLUTION та STOP SOLUTION інших серій.

- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникати потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;

- **TMB SOLUTION** має бути безбарвним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникати контакту **TMB SOLUTION** з металами або іонами металів. Для роботи використовувати лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- ні в якому разі не використовувати один і той же посуд для **CONJUGATE SOLUTION** та **TMB SOLUTION**.

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищезазначених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометра).

5.2. Заходи безпеки

- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;
- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;
- не піпетувати розчини ротом;
- позитивний та негативний контролю тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore не містять компонентів людського походження;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потрапленні **TMB SOLUTION**, **STOP SOLUTION** та **CONJUGATE SOLUTION** на слизові оболонки та шкіру необхідно негайно промити уражене місце великою кількістю води;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоту спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автокладувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування тест-системи. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (EDTA, літій-гепарин, цитрат натрію, фторид калію) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаування досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,21 mg/ml (361,8 μmol/l), гемоглобіну в концентрації до 10 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min перед використанням!

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках слід відкривати [ELISA STRIPS] лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкрити вакуумну упаковку, відокремити необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакувати з вологопоглиначем та *зберігати щільно закритими на замок (zip-lock)* за температури 2-8°C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання необхідно розвести концентрат [WASH TWEEN|20X] 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 ml концентрату + 76 ml води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання потрібно прогріти флакон за температури 37 °C до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °C не більше 7 днів.

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 з пунктом 8.2.
- 9.4. Внести в усі лунки планшета по 80 µl [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 20 µl контролів та досліджуваних зразків: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL -], в решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення, відбувається зміна кольору розчину в лунках з коричнево-зеленого на синій.
- 9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 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 не менш ніж по 300 µl розчином для промивання, залишити не менш як на 30 s;
 - аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 µl;
 - повторити процедуру промивання ще чотири рази;
 - після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.
- 9.8. В лунки внести по 100 µl [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 min за температури 37 °C.
- 9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.7.
- 9.10. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Інкубувати стрипи протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.
- 9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION], дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні [TMB SOLUTION].
- 9.13. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання слід переконавшись у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в одноквильовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише [TMB SOLUTION] та [STOP SOLUTION]).

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю (Nc), рівень граничного значення (Cut off - CO) та індекс позитивності зразка (IP_{sample}):

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,25$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CONTROL +	$OG \geq 1,5$
CONTROL -	$OG \leq 0,150$
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

Якщо одне зі значень ОГ негативного контролю виходить за межі вказаного вище інтервалу, його відкидають і розраховують Nc за рештою значень ОГ негативного контролю. Якщо більш ніж одне значення ОГ негативного контролю не відповідає зазначеним вимогам, то тест вважається некоректним і потребує повторного аналізу.

10.3. Інтерпретація результатів

$OD_{sample} > CO,$ де $OD_{sample} - OG_{зразка}$	ПОЗИТИВНИЙ*
$OD_{sample} < CO$	НЕГАТИВНИЙ**

*Зразки зі значенням оптичної густини вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore. Після повторного тестування **ПОЗИТИВНИМИ** в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore вважаються зразки, оптична густина котрих хоча б в одному з повторів була вищою або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні оптична густина зразка в обох повторах була нижче граничного значення, такий зразок вважати негативним.

Зразки зі значенням оптичної густини нижче граничного значення вважаються **негативними в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore. Однак результати в межах 10 % нижче граничного значення слід інтерпретувати з обережністю (рекомендується повторно дослідити такі зразки в двох лунках тест-системи).

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість та специфічність тест-системи Vitrotest® Anti-HBcore оцінювали з використанням комерційної панелі сироваток крові людини «Контроль АТ(+/-)HBcoreAg-МБА» виробництва ТОВ «МедБіоАльянс» (Україна), що складається з 8 охарактеризованих зразків. В тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore всі позитивні зразки визначені як позитивні, негативні – як негативні.

Також в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore були протестовані контрольні зразки QCRTHBcQC1 - Total Anti-HBc Quality Control Serum Sample 1 NIBSC code: 16/B704-02, QCRTHBcQC2 - Total Anti-HBc Quality Control Serum Sample 2 NIBSC code: 14/B651-04, QCRHBcIqMQC1 - IgM Anti-HBc Quality Control Serum Reagent Sample 1 NIBSC code: 07/B498 виробництва NIBSC (Великобританія) та визначені як позитивні відповідно до паспортних даних.

При дослідженні 76 зразків сироваток крові хворих на гепатит В в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore, в усіх зразках було виявлено антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В, чутливість склала 100 %. Крім того, в тест-системі Vitrotest® Anti-HBcore було досліджено 304 зразки сироваток крові клінічно здорових донорів, серед яких у 9 зразках було виявлено антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В. В подальших дослідженнях у цих 9 зразках були також виявлені антитіла до поверхневого антигена вірусу гепатиту В.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох зразків з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторах на одній серії тест-системи.

N° зразку	$OG_{сер}$	CV, %
950	0,467	8,4
5s	1,645	7,0

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох зразків з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали протягом чотирьох днів в чотирьох постановках аналізу по 8 повторів в кожному аналізі.

N° зразку	$OG_{сер}$	CV, %
950	0,438	6,4
5s	1,665	5,5

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Інтерпретація результатів повинна проводитися з урахуванням клінічних проявів та даних комплексу лабораторних досліджень. Для діагностики гострого, хронічного або перенесеного гепатиту В, оцінки ефективності терапії рекомендується додатково провести дослідження зразка на інші маркери ВГВ, виявлення ДНК та оцінку біохімічних показників крові пацієнта.

Позитивний результат у тест-системі Vitrotest® Anti-HBscore є свідченням наявності у пацієнта антитіл до корового антигена вірусу гепатиту В.

Негативний результат в тест-системі Vitrotest® Anti-HBscore не виключає інфікування ВГВ пацієнта, особливо на ранніх стадіях ВГВ інфекції.

Антитіла до корового антигена вірусу гепатиту В не є показником протективного імунітету. Виявлення антитіл до HBscore антигена у пацієнта не є доказом наявності вірусу гепатиту В в організмі, ці антитіла виявляються при гострому, хронічному та перенесеному в анамнезі гепатиті В. Для коректної діагностики гепатиту В рекомендується провести дослідження зразка на наявність HBsAg та антитіл до HBsAg (наприклад, у тест-системах Vitrotest® HBsAg та Vitrotest® Anti-HBs, відповідно).

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів досліджень, анамнезу та клінічної картини.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 МΩ·см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер
<i>Значення ОГ позитивного контролю нижче встановленої межі</i>	
Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання
<i>Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині</i>	
Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера

ЛІТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // Clinical Microbiology Review – 1999 – Vol.12, N° 2 - p. 351–366
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // Clin. Lab. - 2001. - V. 47, N 1-2. - P. 51-55.
3. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // Postgrad. Med. J. - 2001. - V. 77. - P. 498-505.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення <n> кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (Ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Мінекономрозвитку України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	секунда хвилина година	s min h	с хв год
Довжина	сантиметр нанометр міліметр	cm nm mm	см нм мм
Об'єм, місткість	літр мілілітр мікролітр	l ml µl	л мл мкл
Кількість речовини	моль мілімоль мікромоль	mol mmol µmol	моль млмоль мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Anti-HBcore_TK018_V01

Редакція Інструкції № 1 від 02.08.2021 р.

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент»,
вул. М.Бойчука 186, оф. 56, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)
вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження виробництва)

tel.: +38 (044) 222-76-72, +38 (097) 222-76-72

e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



UA.TR.099

Vitrotest® Anti-HBcore

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °С перед використанням



Внести 80 µl [SAMPLE DILUENT] в лунки стрипів
(коричнево-зелений)



Внести 20 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 та інші лунки – досліджувані зразки

(колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °С



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Додати 100 µl [CONJUGATE SOLUTION] в кожную лунку
(зелений колір)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 30 min при 37 °С



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в кожную лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



Зупинити реакцію додаванням 100 µl [STOP SOLUTION]
(колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густину (OD) при 450/620-695nm

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,25;$$

Nc - середнє значення ОГ з [CONTROL -],
 CO - граничне значення

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OD_{sample} > CO,$ де $OD_{sample} - OG_{зразка}$	ПОЗИТИВНИЙ
$OD_{sample} < CO$	НЕГАТИВНИЙ

Vitrotest® Anti-HCV

Імуноферментна тест-система для виявлення сумарних антитіл до вірусу гепатиту С

TK060
192 аналізи



1. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментна тест-система Vitrotest® Anti-HCV призначена для виявлення сумарних антитіл до вірусу гепатиту С (ВГС) у сироватці чи плазмі крові людини. Тест-набір може бути застосований як для проведення імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, близько 150 мільйонів людей хронічно інфіковані вірусом гепатиту С і щорічно більше 350 тисяч осіб вмирають від пов'язаних з гепатитом С хвороб печінки. Захворювання може мати гострий або хронічний перебіг, при цьому найчастіше протікає без виражених симптомів. Однак, хронізація інфекції призводить до цирозу печінки та розвитку гепатоцелюлярної карциноми.

Збудником гепатиту С є маленький вкритий оболонкою вірус (50 nm в діаметрі), що містить одноланцюгову РНК, належить до родини флавівірусів. В складі геному ВГС виділяють зони, що кодують структурні та неструктурні білки. До структурних антигенів вірусу належать нуклеокапсидний білок – core та два білки зовнішньої оболонки – E1 і E2. Неструктурні білки представлені комплексом білків з ферментативною активністю – NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a та NS5b. У відповідь на інфікування вірусом в організмі людини продукуються специфічні антитіла до всіх білків вірусу.

Сучасна лабораторна діагностика гепатиту С базується на виявленні специфічних маркерів інфікування ВГС: антигенів вірусу, антитіл до вірусних білків та РНК вірусу в біологічних рідинах організму. Найбільш раннім маркером ВГС-інфекції є вірусна РНК, яка виявляється в крові інфікованого через 2-6 тижнів від моменту інфікування. Через один-два тижні у крові виявляється core антиген вірусу гепатиту С. На 6-8 тижні організмом продукуються специфічні антитіла класу IgM. Як при гострому, так і при хронічному гепатиті С ці антитіла можуть виявлятися тривалий час і являються маркером активної вірусної реплікації. Низькі титри анти-ВГС IgM антитіл виявляються у 50-80 % випадків хронічного гепатиту С. У більшості інфікованих антитіла класу IgG спочатку з'являються до епітопів білків core та NS3, і лише пізніше (через 20-22 тижні після інфікування) до NS4. Окрім того, інтенсивність продукції антитіл до білку NS4 у деяких генотипів ВГС нижче, в той же час кількість антитіл до білків core та NS3 висока для всіх генотипів.

На сьогоднішній день з метою первинної діагностики вірусного гепатиту С та тестування донорської крові для виявлення специфічних до ВГС антитіл переважно застосовують ІФА, в якому використовуються рекомбінантні білки core, NS3, NS4 та NS5.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення антитіл, специфічних до ВГС, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV базується на принципі «непрямого» твердофазного ІФА у двоетапній інкубації. В лунках планшету засорбовані рекомбінантні антигени вірусу гепатиту С core, NS3, NS4 та NS5. Під час першого етапу інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета, специфічні до ВГС антитіла, якщо вони присутні, зв'язуються з антигенами на твердій фазі. Лунки відмиваються для видалення нез'язаних антитіл, залишаються лише специфічні комплекси антиген-антитіло. Після цього додається суміш кон'югатів антивидових (анти-IgG та анти-IgM) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, які зв'язуються з імунами комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Комплекси антиген-антитіло виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 30 min інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразка, дозволяє виявити наявність або відсутність антитіл до ВГС. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антитіл, зв'язаних з антигенами на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	2x96 лунок	ІФА-планшет В кожній лунці планшету засорбовані рекомбінантні антигени ВГС core, NS3, NS4 та NS5. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунок.
CONTROL +	1x0,7 ml	Позитивний контроль Розчин специфічних імуноглобулінів з консервантом (рожевий).
CONTROL -	1x1,8 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий).
SAMPLE DILUENT	1x20 ml	Розчин для розведення сироваток Буферний розчин з детергентом та консервантом (коричнево-зелений).
CONJUGATE SOLUTION	1x22 ml	Розчин кон'югату Буферний розчин моноклональних антитіл до IgG та IgM людини, кон'югованих з пероксидазою хрому, зі стабілізаторами та консервантом (зелений), готовий до використання.
TMB SOLUTION	1x22 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x80 ml	Розчин для промивання Tw (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x22 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (4), бланк внесення проб (2) та інструкція з використання.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- Автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 μ l та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620–695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10–1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 37 °C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

Примітка: допускається використання WASH TWEEN 20X, TMB SOLUTION та STOP SOLUTION інших серій.

- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникати потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;
- TMB SOLUTION має бути безбарвним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникати контакту TMB SOLUTION з металами або іонами металів. Для роботи використовувати лише чи-

стий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

- ні в якому разі не використовувати один і той же посуд для **CONJUGATE SOLUTION** та **TMB SOLUTION**.

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищенаведених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометру).

5.2. Заходи безпеки

- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;
- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;
- не піпетувати розчини ротом;
- позитивний та негативний контролі тест-системи Vitrotest® Anti-HCV не містять компонентів людського походження;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потраплянні **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** та **CONJUGATE SOLUTION** на слизові оболонки та шкіру необхідно негайно промити уражене місце великою кількістю води;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоти спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автоклакувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування тест-системи. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (EDTA, літій-гепарин, цитрат натрію, фторид калію) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням слід розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаування досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити зразок від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 хmin. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) з вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактеріальним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,1 mg/ml (17,3 µmol/l), гемоглобіну в концентрації до 5 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min перед використанням!

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках слід відкрити **ELISA STRIPS** лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкрити вакуумну упаковку, відокремити необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакувати з вологопоглиначем та **зберігати щільно закритими на замок (zip-lock)** за температури 2-8 °C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання розвести концентрат [WASH TWEEN|20X] 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 ml концентрату + 76 ml води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання прогріти флакон за температури 37 °C до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °C не більше 7 днів.

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 з пунктом 8.2.
- 9.4. Внести в усі лунки планшета по 80 μ l [SAMPLE DILUENT].
- 9.5. Внести в лунки по 40 μ l контролів та досліджуваних зразків: в лунку A1 – [CONTROL +], в лунки B1, C1 та D1 – [CONTROL -], в решту лунок – досліджувані зразки. Обережно піпетувати суміш в лунках, не допускаючи піноутворення. Під час внесення зразків відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на синій.
- 9.6. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 60 min 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 не менш ніж по 300 μ l розчином для промивання, залишити не менш як на 30 s;
 - аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 μ l;
 - повторити процедуру промивання ще чотири рази;
 - після останньої аспірації позбавитись зайвої вологоти, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.
- 9.8. В лунки внести по 100 μ l [CONJUGATE SOLUTION]. Стрипи накрити новою клейкою плівкою та інкубувати протягом 30 хвилин за температури 37 °C.
- 9.9. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів, як описано в п. 9.7.
- 9.10. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 μ l [TMB SOLUTION] в лунки.
- 9.11. Інкубувати стрипи протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.
- 9.12. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 μ l [STOP SOLUTION], дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні [TMB SOLUTION].
- 9.13. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання слід переконатися у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише [TMB SOLUTION] та [STOP SOLUTION]).

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю (Nc) та рівень граничного значення (Cut off - CO).

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,3$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

[CONTROL +]	ОГ \geq 1,500
[CONTROL -]	ОГ \leq 0,100
[CONTROL -]	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

Якщо одне зі значень ОГ негативного контролю виходить за межі вказаного вище інтервалу, його відкидають і розраховують Nc за рештою значень ОГ негативного контролю. Якщо більш ніж одне значення ОГ негативного контролю не відповідає зазначеним вимогам, то тест вважається некоректним і потребує повторного аналізу.

10.3. Інтерпретація результатів

$OD_{\text{sample}} > CO,$ де $OD_{\text{sample}} - OG_{\text{зразка}}$	ПОЗИТИВНИЙ*
$0,9 \times CO \leq OD_{\text{sample}} \leq CO$	НЕВИЗНАЧЕНИЙ**
$OD_{\text{sample}} < 0,9 \times CO$	НЕГАТИВНИЙ

*Зразки із значенням OG вище граничного значення вважаються первинно позитивними. Такі зразки мають бути досліджені повторно в двох лунках тест-системи Vitrotest® Anti-HCV. Після повторного тестування **позитивними** вважаються зразки, OG котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні OG зразка в обох повторах була нижче граничного значення такий зразок вважається **негативним**.

**Невизначені зразки рекомендується дослідити повторно. Якщо результати знову будуть в межах невизначених, слід провести відбір нового зразка.

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість та специфічність тест-системи Vitrotest® Anti-HCV оцінювали за допомогою комерційної панелі «Стандарт АТ(+/-)ВГС-МБА» виробництва ТОВ «МедБіоАльянс» (Україна). В тест-системі Vitrotest® Anti-HCV всі позитивні та негативні зразки визначались коректно, відповідно до паспортних даних панелі.

При дослідженні 161 зразка сироваток крові пацієнтів, хворих на гепатит С, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV всі зразки були визначені позитивними, чутливість склала 100 %. Крім того, в тест-системі Vitrotest® Anti-HCV було досліджено 299 зразків сироваток крові клінічно здорових донорів, серед яких не було виявлено хибнопозитивних результатів, специфічність склала 100 %.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторах на одній постановці тест-системи.

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
182L	0,705	7,8
1172L	1,441	6,5

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
182L	0,688	7,1
1172L	1,432	7,0

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Для діагностики гострого, хронічного або перенесеного гепатиту С, оцінки ефективності терапії рекомендується додатково провести дослідження зразка на наявність антитіл до окремих білків ВГС та анти-ВГС IgM антитіл (наприклад, у тест-системах Vitrotest® Anti-HCV Different та Vitrotest® HCV-IgM, відповідно), РНК ВГС та оцінити біохімічні показники сироватки крові.

Сучасні методи виявлення антитіл до ВГС не можуть забезпечити виявлення всіх інфікованих пацієнтів. Негативний результат не виключає інфікування вірусом гепатиту С пацієнта, особливо, якщо він проходить імуносупресивне лікування або інфікований ВІЛ, а також на ранніх стадіях гепатитної інфекції.

Будь-який з методів ІФА може допустити хибнопозитивну реакцію. Для виключення хибнопозитивних результатів рекомендується провести верифікаційне дослідження з визначенням антитіл до окремих білків ВГС та РНК вірусу гепатиту С.

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів досліджень, анамнезу та клінічної картини.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 М Ω -см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер
<i>Значення ОГ позитивного контролю нижче встановленої межі</i>	
Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання
<i>Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині</i>	
Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера

ЛІТЕРАТУРА

1. Brillanti S., Masci C., Miglioli M. and Barbara L. Serum IgM antibodies to hepatitis C virus in acute and chronic hepatitis C. // Archives of virology supplementum. - 1993. – N8. – P.213-218.
2. Casno C., Lilli D., Rivanera D., et. al. Diagnostic value of anti-hepatitis C virus (HCV) core immunoglobulin M in recurrence of HCV infection after orthotropic liver transplantation. // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – V.37. – N.8. – P.2726-2728.
3. Dal Molin G., Tiribelli C. Campello C. A rational use of laboratory tests in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Annals of hepatology. - 2003. – N2. – P.76-83.
4. Richter S. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. // Journal of Clinical Microbiology. - 2002. – V.40. – N.12. – P.4407-4412.
5. Urdea M.S., Wuestehube L.J., Laurenson P.M., and Wilber J.C. Hepatitis C – diagnosis and monitoring. // Clinical Chemistry. - 1997. – V.43. – N.8. – P.1507-1511.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення $<n>$ кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Мінекономрозвитку України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	секунда	s	с
	хвилина	min	хв
	година	h	год
Довжина	сантиметр	cm	см
	нанометр	nm	нм
	міліметр	mm	мм
Об'єм, місткість	літр	l	л
	мілілітр	ml	мл
	мікролітр	µl	мкл
Кількість речовини	моль	mol	моль
	мілімоль	mmol	млмоль
	мікромоль	µmol	мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
	нанограм	ng	нг
	мікрограм	µg	мкг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_Anti-HCV_TK060_V01

Редакція Інструкції № 1 від 06.08.2021 р.

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент»,
вул. М.Бойчука 186, оф. 56, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)
вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження виробництва)

tel.: +38(044)222-76-72, +38(097)222-76-72
e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



UA.TR.099

Vitrotest® Anti-HCV

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °С перед використанням



Внести 80 µl **SAMPLE DILUENT** в лунки стрипів
(коричнево-зелений)



Внести 40 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – **CONTROL +**,

B1, C1, D1 – **CONTROL -**,

E1 та інші лунки – досліджувані зразки

(колір змінюється з коричнево-зеленого на синій)



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 60 min при 37 °С



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Додати 100 µl **CONJUGATE SOLUTION** в кожную лунку
(зелений колір)



Промити лунки 5 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в кожную лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



Зупинити реакцію додаванням 100 µl **STOP SOLUTION**
(колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густину (OD) при 450/620-695 nm

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3; \quad CO = Nc + 0,3;$$

Nc - середнє значення ОГ з **CONTROL -**,
CO - граничне значення

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OD_{sample} > CO,$ де OD_{sample} – ОГ зразка	ПОЗИТИВНИЙ*
$0,9 \times CO \leq OD_{sample} \leq CO$	НЕВИЗНАЧЕНИЙ**
$OD_{sample} < 0,9 \times CO$	НЕГАТИВНИЙ

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 імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Вірус гепатиту В (ВГВ) є оболонковим вірусом родини *Нерадnaviridae*, що містить ДНК. Гепатит В (ГВ) має тривалий інкубаційний період у 45-160 днів (в середньому 120 днів). Основними симптомами хвороби є: втома, втрата апетиту, неприємні відчуття у шлунку, нудота, блювота, лихоманка та жовтуха. Гострий ГВ часто завершується спонтанно після 4-8-тижневої хвороби. В інших випадках захворювання триває 6 місяців або більше. Цей стан відомий як хронічний ГВ.

Хронічна інфекція виникає більш, ніж у 90 % інфікованих новонароджених, 25–50 % дітей, інфікованих у віці 1-5 років, і 6–10 % дітей старших за 5 років та дорослих. Як наслідок, понад 350 мільйонів людей у світі постійно інфіковані ВГВ. У значного числа пацієнтів хронічний ГВ призводить до цирозу печінки та карциноми. Цироз виникає у приблизно одного з п'яти людей з хронічним ГВ. Перенесення вірусу відбувається внаслідок контакту пошкодженої шкіри та слизових оболонок з заразними рідинами організму, такими, як кров, вагінальні та менструальні рідини, сім'я.

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. 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 і досить високою концентрацією. 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 ng/ml до сотень µg/ml. Серед лабораторних методів визначення HBsAg найбільш поширеним та високочутливим є ІФА, що використовується як для діагностики захворювання, так і для скринінгу донорської крові з метою попередження передачі гепатиту В.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Виявлення HBsAg в тест-системі Vitrotest® HBsAg ґрунтується на твердофазному «сандвіч» методі ІФА. У лунках планшету засорбовані моноклональні антитіла, специфічні до HBsAg. До лунк додаються зразки сироватки або плазми пацієнта та другі антитіла, кон'юговані з ферментом пероксидазою хрому. Під час інкубації, в разі наявності HBsAg в зразку, на твердій фазі формується імунокомплекс антитіло-HBsAg-антитіло. Незв'язані компоненти видаляються під час відмивання. Зв'язані імунокомплекси виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. Після 30 min інкубації реакція зупиняється і оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm. Значення ОГ, отримане для зразку, дозволяє виявити наявність або відсутність антигену. Інтенсивність жовтого забарвлення пропорційна кількості антигену, зв'язаного на твердій фазі.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

ELISA STRIPS	2x96 лунк	ІФА-планшет У кожній лунці планшету засорбовані моноклональні антитіла до HBsAg. Лунки можна відокремлювати. 12 стрипів по 8 лунк.
--------------	-----------	---

CONTROL +	1x1,8 ml	Позитивний контроль Розчин рекомбінантного поверхневого антигену вірусу гепатиту В у буфері з консервантом (рожевий).
CONTROL –	2x1,8 ml	Негативний контроль Розчин альбуміну з консервантом (жовтий)
CONJUGATE DILUENT	1x13 ml	Розчин для розведення кон'югату Буферний розчин з детергентом та консервантом (рожевий).
CONJUGATE 11x	1x1,3 ml	Кон'югат (11x) 11-ти кратний концентрат кон'югату моноклональних антитіл до HBsAg з пероксидазою хрому у буферному розчині зі стабілізаторами (синій).
TMB SOLUTION	1x22 ml	Розчин ТМБ Розчин ТМБ, H ₂ O ₂ , стабілізатор, консервант (безбарвний), готовий до використання.
WASH TWEEN 20X	1x80 ml	Розчин для промивання Tw20 (20x) 20-ти кратний концентрат фосфатного буферу з Твіном-20 та NaCl (безбарвний).
STOP SOLUTION	1x22 ml	Стоп-реагент Розчин 0,5 mol/l H ₂ SO ₄ (безбарвний), готовий до використання.

Клейка плівка (2), бланк внесення проб (2) та інструкція з використання.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- Автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 μ l та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620–695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10–1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 42 °C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;

*Примітка: допускається використання **WASH TWEEN 20X**, **TMB SOLUTION** та **STOP SOLUTION** інших серій.*

- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникати потраплення прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;
- **TMB SOLUTION** має бути безбарвним перед використанням. Якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір, його не можна використовувати. Уникати контакту **TMB SOLUTION** з металами або іонами металів. Для роботи використовувати лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;
- ні в якому разі не використовувати один і той же посуд для розчину кон'югату та **TMB SOLUTION**.

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищенаведених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання спектрофотометру).

5.2. Заходи безпеки

- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;
- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;
- не піпетувати розчини ротом;
- позитивний та негативний контролю тест-системи Vitrotest® HBsAg не містять компонентів людського походження;
- деякі компоненти тест-системи містять низькі концентрації шкідливих речовин та можуть спричинити подразнення шкіри та слизових оболонок. При потрапленні **TMB SOLUTION** **STOP SOLUTION** та розчин кон'югату на слизові оболонки та шкіру необхідно негайно промити уражене місце великою кількістю води;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоту спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автоклавувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування тест-системи. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (літій-гепарин, цитрат натрію, калію фторид) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням слід розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити зразок від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) з вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактеріальним проростом.

На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобіну в концентрації до 1 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

Ні в якому разі не використовувати для дослідження зразки, що містять розчин азиду натрію.

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min перед використанням!

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках слід відкривати **ELISA STRIPS** лише після витримання 30 min за кімнатної температури. Потім розкривати вакуумну упаковку, відокремити необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакувати з вологопоглиначем та **зберігати щільно закритими на замок (zip-lock)** за температури 2-8 °C. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Приготування розчину для промивання

Для приготування розчину для промивання розвести концентрат **WASH TWEEN 20X** 1:20 (1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішати. Наприклад, 4 мл концентрату + 76 мл води, що достатньо для 8 лунок. У випадку наявності кристалів у концентраті розчину для промивання прогріти флакон за температури 37 °С до повного розчинення кристалів (15 - 20 min). Розведений розчин можна зберігати за температури 2-8 °С не більше 7 днів.

8.3. Приготування розчину кон'югату

Робоче розведення кон'югату готується безпосередньо перед використанням наступним чином:

Розвести **CONJUGATE 11X** (синій) у чистому флаконі **CONJUGATE DILUENT** (рожевий) у співвідношенні 1:11 (тобто, 1+10), розчин забарвлюється у фіолетовий колір. Наприклад, для 16 лунок аналізу додати до 1 мл **CONJUGATE DILUENT** 100 μ л **CONJUGATE 11X**.

Розчин є стабільним протягом 8 h при зберіганні за температури 18-25 °С

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 з пунктом 8.2.

9.4. Приготувати розчин кон'югату згідно пункту 8.3.

9.5. Внести в лунки по 100 μ л **контролів** та досліджуваних зразків: в лунку А1 – **CONTROL +**, в лунки В1, С1 та D1 – **CONTROL -**. В решту лунок – досліджувані зразки.

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

9.7. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 min при температурі 42 °С.

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 не менш ніж по 300 μ л розчином для промивання, залишити не менш як на 30 s;
- аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 μ л;
- повторити процедуру промивання ще п'ять разів;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

9.9. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 μ л **TMB SOLUTION** в лунки

9.10. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °С. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.

9.11. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 μ л **STOP SOLUTION**, дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні **TMB SOLUTION**.

9.12. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання переконайтеся у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

*Облік результатів аналізу можна проводити в одноквільвовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише **TMB SOLUTION** та **STOP SOLUTION**).*

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю (Nc) та рівень граничного значення (Cut off - CO).

$$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3;$$

$$CO = Nc + 0,07;$$

10.2. Достовірність результатів аналізу

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

CONTROL +	ОГ \geq 1,500
CONTROL -	ОГ \leq 0,150
CONTROL -	$Nc \times 0,5 \leq Ncn \leq Nc \times 2,0$

Якщо одне зі значень ОГ негативного контролю виходить за межі вказаного вище інтервалу, його відкидають і розраховують N_c за рештою значень ОГ негативного контролю. Якщо більш ніж одне значення ОГ негативного контролю не відповідає зазначеним вимогам, то тест вважається некоректним і потребує повторного аналізу.

10.3. Інтерпретація результатів

$OG_{\text{зразка}} > CO$	ПОЗИТИВНИЙ*
$OG_{\text{зразка}} < CO$	НЕГАТИВНИЙ**

* Зразки зі значенням оптичної густини 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, оптична густина котрих хоча б в одному з повторів була вище або дорівнювала граничному значенню. Якщо при повторному тестуванні оптична густина зразка в обох повторах була нижче граничного значення такий зразок вважати негативним.

** 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 зразки в двох лунках тест-системи).

Для верифікації специфічності реакції кожен позитивний результат (відповідно до критеріїв інтерпретації тест-системи Vitrotest® HBsAg) необхідно підтвердити в нейтралізаційному ІФА з використанням комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation.

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Специфічність та чутливість

Межу чутливості аналізу щодо виявлення поверхневого антигену вірусу гепатиту В в тест-системі Vitrotest® HBsAg визначали з використанням Міжнародного стандарту WHO International Standard Third International Standard for HBsAg (HBV genotype B4, HBsAg subtypes ayw1/adw2) NIBSC code: 12/226 (NIBSC, Великобританія). Чутливість тесту щодо виявлення HBsAg з використанням даного стандарту становила 0,05 IU/ml.

Для оцінки діагностичних характеристик тест-системи Vitrotest® HBsAg було використано комерційну панель охарактеризованих зразків сироваток крові, що містять та не містять HBsAg «Контроль (+/-) HBsAg- МБА» (ТОВ «Медбіоальянс», Україна). В тест-системі Vitrotest® HBsAg отримано результати, що повністю співпадають з паспортними даними на панель: всі сироватки, що містять поверхневий антиген були визначені як позитивні, а ті, що не містять, визначені як негативні.

Для визначення чутливості тест-системи Vitrotest® HBsAg було протестовано 76 зразків, отриманих від пацієнтів, хворих на гепатит В, що визначені як зразки з «істинним» клінічним станом. При цьому, поверхневий антиген вірусу гепатиту В (HBsAg) був виявлений у 76 зразках, а чутливість тест-системи Vitrotest® HBsAg становить 100,0%.

Специфічність тест-системи Vitrotest® HBsAg була протестована на 304 зразках сироваток крові клінічно здорових донорів (серонегативні по відношенню до вірусу гепатиту В), та становить 100,0 %.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем HBsAg оцінювали в 32 повторах на одній постановці тест-системи.

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
543	2,936	4,1
304	0,719	6,5

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	$OG_{\text{сеп}}$	CV, %
543	2,930	4,0
304	0,704	5,6

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Негативний результат в тест-системі Vitrotest® HBsAg показує, що тестований зразок не містить HBsAg, або його концентрація нижче 0,05 IU/ml. Оскільки зразок може містити HBsAg в дуже низькій концентрації, негативний результат в тест-системі Vitrotest® HBsAg не дає можливості повністю виключити інфікування вірусом гепатиту В.

Окрім того, в літературі описано деякі випадки вірусного гепатиту В (гострого чи хронічного), коли в зразку виявлялась вірусна ДНК за умови відсутності HBsAg. В таких випадках корисним буде дослідження зразка на інші маркери вірусного гепатиту В, виявлення ДНК та оцінка біохімічних показників сироватки крові пацієнта.

Для коректної діагностики гепатиту В рекомендується провести дослідження зразка на наявність специфічних антитіл класу IgM та IgG до HBcore антигену та антитіл до HBsAg (наприклад, у тест-системах Vitrotest® HBcore-IgM, Vitrotest® HBcore-IgG та Vitrotest® Anti-HBs, відповідно).

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів досліджень, анамнезу та клінічної картини.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 МΩ·см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер
<i>Значення ОГ позитивного контролю нижче встановленої межі</i>	
Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання
<i>Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині</i>	
Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера

ЛІТЕРАТУРА

1. Mahoney F.J. Update on Diagnosis, Management, and Prevention of Hepatitis B Virus Infection // Clinical Microbiology Review – 1999 – Vol.12, № 2 - p. 351–366
2. Maddrey W.C. Hepatitis B - an important public health issue // Clin. Lab. - 2001. - V. 47, N 1-2. - P. 51-55.
3. Walsh K., Alexander G.J.M. Update on chronic viral hepatitis // Postgrad. Med. J. - 2001. - V. 77. - P. 498-505.
4. Hsia C.C., Scudamore C.H., Di Bisceglie A.M., Tabor E. Molecular and serological aspects of HBsAg-negative hepatitis B virus infections in North America // J. Med. Virol. - 2003. - V.70, N 1. - P. 20-26.

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення n кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (Ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Міністерства розвитку України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	секунда	s	с
	хвилина	min	хв
	година	h	год
Довжина	сантиметр	cm	см
	нанометр	nm	нм
	міліметр	mm	мм
Об'єм, місткість	літр	l	л
	мілілітр	ml	мл
	мікролітр	μl	мкл
Кількість речовини	моль	mol	моль
	мілімоль	mmol	млмоль
	мікромоль	μmol	мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_HBsAg_TK059_V01

Редакція Інструкції № 1 від 02.08.2021 р.

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент».

вул. М.Бойчука 18б, оф. 56, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)

вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження виробництва)

tel.: +38(044)222-76-72, +38(097)222-76-72

e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



UA.TR.099

Vitrotest® HBsAg

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °С перед використанням



Внести по 100 µl контролів та зразків у лунки:

A1 – [CONTROL +],

B1, C1, D1 – [CONTROL -],

E1 та інші лунки – досліджувані зразки



Внести по 50 µl розчину кон'югату в лунки



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 120 min при 42 °С.



Промити лунки 6 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в кожену лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °С



Зупинити реакцію додаванням 100 µl [STOP SOLUTION]
(колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густина (OD) при 450/620-695 nm

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

$Nc = (Nc1 + Nc2 + Nc3) / 3$; $CO = Nc + 0,07$;

Nc - середнє значення ОГ з [CONTROL -].
 CO - граничне значення

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

$OG_{зразка} > CO$	ПОЗИТИВНИЙ
$OG_{зразка} < CO$	НЕГАТИВНИЙ

Vitrotest® HBsAg -Confirmation

Комплект реагентів для підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В

TK017
96 аналізів

**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 імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

2. КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Вірус гепатиту В (ВГВ) є оболонковим вірусом родини *Hepadnaviridae*, що містить ДНК. Гепатит В (ГВ) має тривалий інкубаційний період у 45-160 днів (у середньому 120 днів). Наявність симптомів при гострому ГВ зворотно корелює з віком: менш ніж 1% новонароджених та 30–50% дорослих мають симптоми ГВ. Особи з симптомами, які є загальними для всіх типів вірусного гепатиту, звичайно страждають від втоми, втрати апетиту, неприємних відчуттів у шлунку, нудоти, блювоти, лихоманки та жовтухи. У менш, ніж 1% випадків, особливо в осіб похилого віку, розвивається блискавичний гепатит, який у більшості випадків є смертельним внаслідок гострого некрозу печінки.

Гострий ГВ часто завершується спонтанно після 4-8-тижневої хвороби. У інших випадках захворювання триває 6 місяців або більше. Цей стан відомий як хронічний ГВ.

Хронічна інфекція виникає більш, ніж у 90% інфікованих новонароджених, 25–50% дітей, інфікованих у віці 1-5 років, і 6–10% дітей старших за 5 років та дорослих. Як наслідок, понад 350 мільйонів людей у світі постійно інфіковані ВГВ.

У значного числа пацієнтів хронічний ГВ призводить до цирозу печінки та карциноми. Цироз виникає у приблизно одного з п'яти людей з хронічним ГВ. З усіх випадків цирозу, приблизно третина має причиною хронічну інфекцію ВГВ.

Перенесення вірусу відбувається внаслідок контакту пошкодженої шкіри та слизових оболонок з заразними рідинами організму, такими, як кров, вагінальні та менструальні рідини, сім'я. Основні шляхи передачі включають: вертикальний - від інфікованої матері при пологах (рівень передачі близько 50%); статевий; горизонтальний - побутовий контакт з інфікованою особою (наприклад, контакт інфекційної крові з подряпинами на шкірі), використання забрудненого обладнання для ін'єкцій ін'єкційними наркоманами, або ж негігієнічні ін'єкційні процедури в закладах охорони здоров'я.

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.

HBsAg – основний маркер інфікування вірусом гепатиту В є структурним білком, що відповідає за адсорбцію вірусу на клітинах гепатоцитів. Це перший маркер, що з'являється у 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 у сироватці крові хворих на вірусний гепатит В може коливатися у широкому діапазоні - від нанограмів до сотень $\mu\text{g/ml}$. 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

Підтвердження наявності поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) базується на твердофазному «сандвіч» методі ІФА з використанням комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation та тест-системи Vitrotest® HBsAg. У лунках планшету засорбовані моноклональні

антитіла, специфічні до HBsAg. Другі моноклональні антитіла входять до складу пероксидазного кон'югату. До складу нейтралізаційного компоненту входить суміш моноклональних антитіл, специфічних до HBsAg. До лунок в дублях додаються зразки сироватки або плазми пацієнта та другі антитіла, кон'юговані з ферментом пероксидазою хрому (з доданим нейтралізаційним компонентом та без нього).

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 «сендвіч»- антитіло-антиген-антитіло. Такий «сендвіч» не утворюється в присутності нейтралізаційного компоненту (моноклональних антитіл, специфічних до HBsAg) - відбувається нейтралізація HBsAg. Незв'язані компоненти потім видаляються під час відмивання планшета. Імунні комплекси виявляються шляхом додавання розчину хромогену 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМБ) з перекисом водню. В результаті реакції розчин у лунках, де утворились імунні комплекси, забарвлюється в синій колір, у лунках, де відбулась нейтралізація HBsAg моноклональними антитілами, забарвлення не розвивається. Після 30-ти мін інкубації реакція зупиняється додаванням стоп-регенту. Оптична густина (ОГ) в лунках визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620-695 nm.

4. МАТЕРІАЛИ ТА ОБЛАДНАННЯ

4.1. Склад набору

NEUTRALIZATION COMP (11x)	1x1 ml	Нейтралізаційний компонент (11x) 11-ти кратний концентрат розчину моноклональних антитіл до HBsAg зі стабілізаторами (зелений).
SAMPLE DILUENT	2x50 ml	Розчин для розведення сироваток Буферний розчин з детергентом та консервантом (фіолетовий).

Бланк внесення проб (1) та інструкція з використання.

4.2. Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

- Автоматичні піпетки змінного об'єму на 10–1000 μ l та наконечники до них;
- спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 nm;
- мірний лабораторний посуд (10-1000 ml);
- деіонізована або дистильована вода;
- термостат на 42 °C;
- автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- контейнери для відходів потенційно зараженого матеріалу;
- таймер;
- фільтрувальний папір;
- одноразові рукавички;
- дезінфікуючі засоби;
- захисний одяг.

5. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

5.1. Застереження

Дотримання часу інкубації та температури є надзвичайно важливим для коректного результату ІФА.

- не використовувати компоненти комплекту реагентів після закінчення строку придатності;
- не використовувати під час аналізу та не змішувати компоненти різних серій, компоненти з тест-систем різних нозологій або реагенти інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest®;
- після використання реагенту закривати кожен флакон своєю кришкою;
- під час промивання контролювати наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;
- кожного разу використовувати новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;
- уникати потрапляння прямих сонячних променів на реагенти тест-системи;

Виробник не несе відповідальність за будь-які некоректні результати та несприятливі випадки, що виникли внаслідок порушень вищенаведених застережень. Виробник не несе відповідальність за візуальний облік результатів аналізу (без використання рідера).

5.2. Заходи безпеки

- постановку аналізу проводити лише в захисному одязі, одноразових рукавичках та захисних окулярах;

- не допускається приймати їжу, пити, палити або користуватися косметикою у кімнаті виконання тесту;
- не піпетувати розчини ротом;
- у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню дезінфікуючим засобом, а потім витерти насухо фільтрувальним папером. В іншому випадку кислоту спочатку потрібно нейтралізувати розчином бікарбонату натрію, а потім витерти поверхню як описано вище.

5.3. Утилізація відходів

- рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 h за кімнатної температури, або гіпохлоритом натрію у кінцевій концентрації 5 % протягом 30 min, або іншими дозволеними дезінфікуючими засобами;
- тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування за температури 121 °C упродовж 1 h;
- не автоклаувати розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;
- видалення інактивованих відходів проводити згідно з чинним законодавством України;
- видалення решти компонентів тест-систем після використання проводити згідно GLP (good laboratory practice) та чинного законодавства України в сфері поводження з відходами.

6. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Реагенти комплексу стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати за температури 2-8 °C. Не допускається заморожування комплексу реагентів. Транспортувати набір за температури 2-8 °C. Допускається одноразове транспортування за температури не вище 23 °C протягом двох днів.

Після першого відкриття первинного пакування компоненти тест-системи є стабільними протягом 3 місяців, окрім тих, що зазначені в п. 8 даної Інструкції.

7. ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Зразки сироватки чи плазми (літій-гепарин, цитрат натрію, калію фторид) крові зберігати за температури 2-8 °C не більше 3 днів після забору. Для більш тривалого зберігання зразки тримати у морозильній камері за температури від -20 до -70 °C. Заморожені зразки перед використанням слід розморозити та витримати за кімнатної температури упродовж 30 min. Не можна використовувати прогріті зразки. Після розморозування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникати повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільнити від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./min протягом 10-15 min. Не використовувати зразки сироваток (чи плазми) із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактеріальним проростом. На результати аналізу не впливає присутність у зразку білірубину в концентрації до 0,21 mg/ml (361,8 µmol/l), гемоглобіну в концентрації до 1 mg/ml і тригліцеридів в концентрації до 10 mg/ml (11,3 mmol/l).

Ні в якому разі не використовувати для дослідження зразки, що містять розчин азиду натрію.

8. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи за кімнатної температури 18-25 °C протягом 30 min 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

Зразки з високою концентрацією поверхневого антигену вірусу гепатиту В >10 µg/ml (оптична густина в тест-системі Vitrotest® HBsAg - вище 3,0 оптичних одиниць) можуть не нейтралізуватися у нерозведеному вигляді. Такі зразки слід досліджувати цільними та розведеними в 100 разів [SAMPLE DILUENT].

Розведення зразків 1:100 готувати наступним чином: до 990 µl [SAMPLE DILUENT] додати 10 µl зразку, який має високе значення оптичної густини в тест-системі Vitrotest® HBsAg.

Процедуру розведення зразків проводити безпосередньо перед аналізом.

8.2. Приготування розчину кон'югату та нейтралізаційного компоненту

Розчин нейтралізаційного компоненту готується на основі розчину кон'югату у робочому розведенні з тест-системи Vitrotest® HBsAg безпосередньо перед використанням.

Для приготування розчину нейтралізаційного компоненту розвести [NEUTRALIZATION COMP11X] (зелений) 1:11 розчином кон'югату у робочому розведенні (фіолетовий), та перемішати.

Наприклад: для дослідження 8 зразків, позитивних на HBsAg у тест-системі Vitrotest® HBsAg, достатньо приготувати 1 ml розчину кон'югату, відібрати 0,5 ml цього розчину та додати до нього 50 µl [NEUTRALIZATION COMP]1X]. Обережно перемішати розчин не допускаючи піноутворення.

Розчин є стабільним протягом 8 h при зберіганні за температури 18-25 °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 компонента згідно пункту 8.2.
- 9.6. За потреби приготувати попереднє розведення 1:100 досліджуванних зразків з високим вмістом HBsAg згідно пункту 8.1.
- 9.7. Контрольні та досліджувані зразки цільні або в розведенні 1:100 внести по 100 µl в **двох повторях** (для прямого та конкурентного ІФА) наступним чином: в лунки A1, A2 – [CONTROL +], в лунки B1, B2, C1, C2 – [CONTROL -], в лунки D1, D2 та інші лунки – досліджувані зразки.
- 9.8. Поверх контролів та досліджуваних зразків внести в непарні стрипи (A1, B1, C1 і т.д.) по 50 µl розчину кон'югату для проведення прямого ІФА, в парні стрипи (A2, B2, C2 і т.д.) по 50 µl розчину кон'югату з нейтралізаційним компонентом для проведення конкурентного ІФА. Для запобігання кросконтамінації зразків, розчини кон'югату та нейтралізаційного компонента слід вносити не торкаючись зразків у лунках. Обережно постукуючи по планшету, перемішати суміш у лунках.
- 9.9. Заклеїти стрипи клейкою плівкою та інкубувати протягом 120 min при температурі 42 °C.
- 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 не менш ніж по 300 µl розчином для промивання, залишити не менш як на 30 с;
 - аспірувати розчин з лунок (залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 µl);
 - повторити процедуру промивання ще п'ять разів;
 - після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.
- 9.11. Не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 µl [TMB SOLUTION] в лунки
- 9.12. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 min в темному місці за кімнатної температури 18-25 °C. Не використовувати клейку плівку на даному етапі.
- 9.13. Для зупинення ферментативної реакції внести в лунки по 100 µl [STOP SOLUTION], дотримуючись тієї ж послідовності, що і при внесенні [TMB SOLUTION].
- 9.14. Виміряти на рідері ОГ в кожній лунці при довжині хвилі 450/620-695 nm протягом 5 min після зупинення реакції. До проведення вимірювання переконайтеся у чистоті зовнішньої поверхні дна лунок та відсутності бульбашок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 nm, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише [TMB SOLUTION] та [STOP SOLUTION]).

10. ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ ТА ЇХ ІНТЕРПРЕТАЦІЯ

10.1. Достовірність результатів аналізу

Розрахувати % нейтралізації для лунок з позитивним контролем (%NTR_{PC}) наступним чином:

$$\%NTR_{PC} = ((OD_{PC,D} - OD_{PC,C}) / OD_{PC,D}) \times 100 \%;$$

де: OD_{PC,D} – ОГ у лунках з позитивним контролем у прямому ІФА;

OD_{PC,C} – ОГ у лунках з позитивним контролем у конкурентному ІФА.

Дані тесту вважаються достовірними, якщо вони відповідають наступним вимогам:

[CONTROL +]	OD _{PC,D} ≥ 1,5
[CONTROL -]	OD ≤ 0,150
% NTR _{PC}	≥ 50 %

10.2. Облік результатів аналізу

Розрахувати середнє значення ОГ негативного контролю в прямому ІФА (N_c), рівень граничного значення (Cut off - CO) та % нейтралізації для досліджуваних зразків (%NTR_{samp}):

$$N_c = (N_{C1} + N_{C2}) / 2;$$

$$CO = OD_{N_c} + 0,07;$$

$$\%NTR_{\text{samp}} = ((OD_{\text{samp,D}} - OD_{\text{samp,C}}) / OD_{\text{samp,D}}) \times 100 \%;$$

де: OD_{samp,D} – ОГ у лунці з досліджуваним зразком у прямому ІФА;
OD_{samp,C} – ОГ у лунці з досліджуваним зразком у конкурентному ІФА

10.3. Інтерпретація результатів

OD _{samp,D} < CO	НЕГАТИВНИЙ
OD _{samp,D} > CO %NTR _{samp} < 50	НЕГАТИВНИЙ*
OD _{samp,D} > CO %NTR _{samp} ≥ 50	ПОЗИТИВНИЙ

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

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

11. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

11.1. Чутливість

Для оцінки діагностичних характеристик комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation було використано комерційну панель охарактеризованих зразків сироваток крові, що містять HBsAg «Контроль (+/-) HBsAg- МБА» (ТОВ «Медбіоальянс», Україна). В тест-системі Vitrotest® HBsAg з використанням комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation отримано результати, що повністю співпадають з паспортними даними на панель: всі сироватки, що містять поверхневий антиген, були підтверджені як позитивні.

Для визначення клінічної чутливості нейтралізаційного аналізу з використанням комплекту реагентів Vitrotest® HBsAg-Confirmation було протестовано 76 зразків, отриманих від пацієнтів, хворих на гепатит В. При цьому, підтверджено наявність поверхнього антигену вірусу гепатиту В за допомогою нейтралізаційного аналізу у 76 зразках, чутливість становить 100,0 %.

11.2. Точність

Повторюваність результатів у межах однієї постановки аналізу (Intra assay repeatability)

Коефіцієнт варіації (CV) відсотку нейтралізації для двох сироваток з різною концентрацією поверхнього антигену HBsAg оцінювали в 32 повторях на одній серії комплекту реагентів.

№ сироватки	ОГ зразку в прямому ІФА	ОГ зразку в конкурентному ІФА	Відсоток нейтралізації, %	CV, %
543	2,877	0,077	97,3	0,58
304	0,785	0,019	97,6	0,37

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

Коефіцієнт варіації (CV) для 2 сироваток з різною концентрацією поверхнього антигену HBsAg оцінювали протягом 4 днів у 4 постановках аналізу по 8 повторів у кожному аналізі.

№ сироватки	ОГ зразку в прямому ІФА	ОГ зразку в конкурентному ІФА	Відсоток нейтралізації, %	CV, %
543	2,963	0,077	97,4	0,51
304	0,728	0,018	97,5	0,45

12. ОБМЕЖЕННЯ АНАЛІЗУ

Постановка діагнозу проводиться лише лікарем з урахуванням отриманих результатів досліджень, анамнезу та клінічної картини.

13. ПРОБЛЕМИ, ЯКІ МОЖУТЬ ВИНИКНУТИ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ІФА, ТА СПОСОБИ ЇХ УСУНЕННЯ

<i>Можливі причини</i>	<i>Способи усунення проблем</i>
<i>Високий фон у лунках всього планшета</i>	
Забруднений промивач	Почистити головку промивача та промити 30 % розчином етилового спирту, потім дистильованою водою
Низька якість або забруднення води	Використовувати очищену воду з питомим опором ≥ 10 МΩ·см.
Використання погано помитого посуду	Використовувати хімічно чистий посуд
Використання дезінфікуючих засобів, що містять хлор	Не використовувати хлорвмісні дезінфікуючі засоби
Використання забруднених наконечників	Використовувати нові наконечники
Збільшено час інкубації або змінено температурний режим	Дотримуватися режиму інкубації відповідно до інструкції з використання
<i>Високий фон в окремих рядах</i>	
Повторне внесення розчину ТМБ	Розчин ТМБ вносити один раз
Забруднення конусу автоматичної піпетки розчином кон'югату	Прочистити піпетку і обережно набирати рідину
Забруднений один із каналів промивача	Почистити канал промивача, промити вошер
<i>Значення ОГ позитивного контролю нижче встановленої межі</i>	
Неправильно внесений або відсутній один із реагентів (кон'югат або розчин ТМБ)	Повторно провести ІФА, звернути увагу на правильність внесення цих реагентів
Скорочено час інкубації на одному з етапів	Проводити інкубацію відповідно до інструкції з використання
<i>Інтенсивність забарвлення лунок не відповідає отриманій оптичній густині</i>	
Зміщений оптичний промінь	Перевірити коректність роботи рідера

ЛІТЕРАТУРА

1. Возіанова Ж.І. Вірусний гепатит В // Інфекційні та парази-тарні 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, N° 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.
6. Hsia C.C., Scudamore C.H., Di Bisceglie A.M., Tabor E. Molecular and serological aspects of HBsAg-negative hepatitis B virus infections in North America // J. Med. Virol. - 2003. - V.70, N 1. - P. 20

ГРАФІЧНІ ПОЗНАЧЕННЯ



Номер за каталогом



Користуйтеся інструкцією із застосування



Медичний виріб для діагностики in vitro



Виробник



Попередження



Достатньо для проведення <л> кількості досліджень



Обмеження температури



Код партії



Використати до



Дата виготовлення



Берегти від прямих сонячних променів



Уповноважений представник в Європейському Співтоваристві



Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером органу з оцінки відповідності (Ідентифікаційний номер органу з оцінки відповідності UA.TR.099)

В інструкції використовуються позначення одиниць вимірювання у відповідності до Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 914 від 04.08.2015 р.

Назва величини	Одиниця		
	назва	позначення	
		міжн.	укр.
Час	секунда	s	с
	хвилина	min	хв
	година	h	год
Довжина	сантиметр	cm	см
	міліметр	mm	мм
	нанометр	nm	нм
Об'єм, місткість	літр	l	л
	мілілітр	ml	мл
	мікролітр	µl	мкл
Кількість речовини	моль	mol	моль
	мілімоль	mmol	млмоль
	мікромоль	µmol	мкмоль
Маса	міліграм	mg	мг
	нанограм	ng	нг
	мікрограм	µg	мкг
Електричний опір	мегаом	MΩ	МОм

ТУ У 24.4-36555928-001:2011

Inst_HBsAg-Confirmation_TK017_V01

Редакція Інструкції № 1 від "02".08.2021 р.

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



ТОВ «Вітротест Біореагент»,
вул. М.Бойчука 18б, оф. 5б, м. Київ, 01103, Україна (юридична адреса)
вул. Курортна, буд. 11, м. Київ, 04075, Україна (місцезнаходження виробництва)

tel.: +38(044)222-76-72, +38(097)222-76-72

e-mail: info@vitrotest.ua, www.vitrotest.ua



UA.TR.099

Vitrotest® HBsAg-Confirmation

СХЕМА АНАЛІЗУ



Витримати всі реагенти та зразки мінімум 30 min при 18-25 °C перед використанням



За потреби розвести досліджувані зразки 1:100 (якщо оптична густина зразків у тест-системі Vitrotest® HBsAg вище 3,000 OD) розчином для розведення сироваток



Розвести концентрат кон'югату (11x) (синій) розчином для розведення кон'югату (рожевий) 1:11. Наприклад, 100 µl кон'югату + 1000 µl розчину для розведення кон'югату (розчин забарвлюється у фіолетовий колір)



Приготувати розчин нейтралізаційного компоненту: розвести **NEUTRALIZATION COMP11X** (зелений) розчином кон'югату у робочому розведенні (фіолетовий).
Наприклад, 50 µl **NEUTRALIZATION COMP11X** + 500 µl розчину кон'югату



Внести по 100 µl контролів та досліджуваних зразків в лунки:

A1, A2 – **CONTROL +**,

B1, B2, C1, C2 – **CONTROL -**,

D1, D2 – та решта лунок в тому ж порядку – цільні досліджувані зразки або в розведенні 1:100.



Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки непарних стрипів внести по 50 µl розчину кон'югату



Поверх досліджуваних зразків обережно в лунки парних стрипів внести по 50 µl розчину кон'югату з нейтралізаційним компонентом



Накрити стрипи клейкою плівкою та інкубувати 120 min при 42 °C.



Промити лунки 6 разів розведеним 1:20 (1+19) розчином для промивання Tw20 (300 µl в лунку)



Внести по 100 µl **TMB SOLUTION** в кожну лунку



Інкубувати 30 min в темноті при 18-25 °C



Зупинити реакцію додаванням 100 µl **STOP SOLUTION**
(колір змінюється з синього на жовтий)



Визначити оптичну густина (OD) при 450/620-695 nm

ОБЛІК РЕЗУЛЬТАТІВ

$$N_c = (N_{C1} + N_{C2}) / 2; CO = OD N_c + 0,07;$$

$$\% NTR_{\text{samp}} = ((OD_{\text{samp},D} - OD_{\text{samp},C}) / OD_{\text{samp},D}) \times 100 \%;$$

де:

OD_{samp,D} – ОГ у лунці з досліджуваним зразком у прямому ІФА;

OD_{samp,C} – ОГ у лунці з досліджуваним зразком у конкурентному ІФА

ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

OD _{samp,D} < CO	НЕГАТИВНИЙ
OD _{samp,D} > CO %NTR _{samp} < 50	НЕГАТИВНИЙ*
OD _{samp,D} > CO %NTR _{samp} ≥ 50	ПОЗИТИВНИЙ