

**НАБОР ИФА  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
АНТИТЕЛ КЛАССА IgM К ВИРУСУ  
ГЕПАТИТА С (HCV)**

**1708-12, HCV IgM**

Каталог. № : 1708-12  
Количество : 96  
Производитель: DAI (США)

Методика от 27-08-2013



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Анализ	HCV IgM ELISA
Метод	Иммуносорбентный анализ с применением фиксированных ферментов
Принцип	Конкурентный ИФА; покрытый антигенами планшет
Диапазон обнаружения	Качественный – положительный; отрицательный контроль и пороговое значение (cut-off)
Образец	10 мкл
Специфичность	99 %
Чувствительность	99 %
Общее время	~ 75 мин.
Срок годности	12-18 мес.

\*Лабораторные результаты не могут быть единственным критерием для медицинского заключения. Принять во внимание историю болезни пациента и дальнейшие тесты.

**НАЗНАЧЕНИЕ**

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения IgM-антител к вирусу гепатита С в человеческой сыворотке или плазме. Он предназначен для исследования доноров крови и для диагностики пациентов с инфекцией вируса гепатита С.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ**

(См. в оригинале инструкции).

**ПРИНЦИП АНАЛИЗА**

Принцип ИФА HCV включает двухэтапную процедуру инкубации, в которой производится непрямой ИФА на IgM антитела к HCV. Перед инкубацией рекомбинантные, высоко иммунореактивные антигены, соответствующие ядерной и неструктурным областям вируса гепатита С, предварительно нанесены на полистирольные стрипы.

Во время первой инкубации, HCV-IgM антитела (если присутствуют) будут связаны с твердой фазой предварительно нанесенных антигенов HCV. Следующим шагом будет промывка лунок для удаления несвязанных материалов. В дальнейшем добавляются кроличьи анти-человеческие антитела IgM (анти-IgM) конъюгированные пероксидазой хрена (HRP-конъюгат). Второй инкубационный этап включает в себя эти помеченные антитела, которые будут связаны с любыми ранее образовавшимися комплексами антиген-IgM. Следующий шаг включает промывку лунок для удаления несвязанного HRP-конъюгата. Затем добавляют в лунки растворы хромогена, содержащие тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись мочевины. Продукт синего цвета развивается в присутствии иммунокомплекса антиген-антитело анти-IgM (HRP) и когда бесцветные хромогены гидролизуются связанным HRP-конъюгатом. После остановки реакции серной кислотой синий цвет изменяется на желтый. Интенсивность окраски можно оценивать пропорционально количеству антител, захваченных в лунках, а также количеству в образце соответственно. Лунки остаются бесцветными, если результат HCV-IgM отрицательный.

**Схема принципа анализа: непрямой ИФА**

(См. в оригинале инструкции).

**КОМПОНЕНТЫ**

▪ **Микролуночный планшет**, зафиксированные в белом держателе пустые микролуночные полоски. Планшет запечатан в пакете из фольги с осушителем. 8x12/12 8-луночные полоски на планшет. Каждая лунка содержит рекомбинантные антигены

HCV. Микролуночные полоски могут использоваться отдельно. Поместите неиспользованные лунки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8 °С.

- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Синяя жидкость во флаконе с зеленой крышкой. 0,5 мл во флаконе.  
Протеин-стабилизирующий буфер, нереактивный к HCV IgM антителам. Консерванты: 0,1% Проклин 300. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Положительный контроль, 1 фл**  
Красная жидкость во флаконе с красной крышкой. 0,5 мл во флаконе.  
Очищенные анти-HCV IgM антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % Проклин 300. Готовый к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Разбавитель образцов, 1 фл.**  
Синяя жидкость в белом флаконе с синей крышкой. 14 мл во флаконе.  
Протеин-стабилизирующий буфер, казеин и раствор цукрозы. Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Реагент HRP-конъюгата, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной/оранжевой крышкой. 14 мл в флаконе.  
HCV-IgM анти-человеческие кроличьи антитела, конъюгированные пероксидазой хрена. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Исходный промывочный буфер, 1 бут.**  
Бесцветная жидкость в прозрачном флаконе с белой крышкой. 50 мл в бутылке. PH 7,4 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента).  
**Разбавить перед использованием!** Концентрат необходимо разбавить 1:20 дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабилен 1 неделю при комнатной температуре или 2 недели при 2-8 °С.
- **Раствор хромогена А, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с зеленой крышкой. 8 мл в флаконе. Раствор перекиси мочевины.  
Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой. 8 мл во флаконе. ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте. Готовый к использованию. После вскрытия стабилен 1 месяц при 2-8 °С.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой. 8 мл в флаконе. Разбавленная серная кислота (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- **Пластиковый герметичный пакет , 1 шт.**  
Для неиспользуемых полосок
- **Картон для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения лунок.
- **Инструкция, 1 экз.**

**ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТ, ЧТО НЕ ПОСТАВЛЯЕТСЯ**

- Свежая дистиллированная или деионизированная вода
- Одноразовые перчатки и часы
- Контейнер для отходов.
- Одноразовые V-образные кюветки.
- Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
- Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
- Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5 °С.
- Микршейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
- Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
- Микропланшетная система для аспирации / промывания.
- Обычный солевой раствор для разбавления образцов.

**СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ**

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна стугиться природным путем. Необходимо проследить, что образцы сыворотки не содержали микроорганизмов. Любые видимые частицы в образце необходимо удалить центрифугированием при 3000 об/мин. 20 минут при комнатной температуре или фильтрацией на 0,22 м фильтре. Плазма, собранная в EDTA, цитрат натрия или гепарин может

тестироваться, но нельзя использовать высоко липемические, иктерические или гемолизированные образцы, что могут дать фальшивые результаты. Не нагревайте инактивированные образцы. Это может вызвать ухудшение образцов.

- Транспортировка и хранение:** Храните образцы при 2-8 °С. Образцы, что не будут анализироваться в течении 3 дней необходимо заморозить до -20 °С или ниже. Избегайте многократных замораживания/оттаивания.

#### СПЕЦИАЛЬНАЯ ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОМЫВКЕ

- Правильная процедура промывки важна для получения корректных и точных данных.
- Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный промыватель хорошего качества. В основном требуется не менее 5 промывочных циклов при 350-400 мкл на лунку для предотвращения ошибочно положительной реакции.
- Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое ячеек, а дайте возможность планшетному промывателю автоматически аспирировать его.
- Мы рекомендуем калибровать промыватель. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносится достаточное количество объема, промывочного буфера.
- При ручном промывании необходимо 5 циклов промывания при 350-400 мкл на лунку и аспирировать жидкость 5 раз. Если получены низкие результаты, увеличьте количество циклов промывания и время выдержки.
- При аспирации жидкости из ячеек, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
- Концентрированный промывочный буфер необходимо разбавить **1:20** перед использованием. Для одного планшета смешайте 50 мл концентрата с 950 мл воды до конечного объема 1000 разбавленного промывочного буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем промывочного буфера.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока пригодности, указанной на этикетке при хранении при 2-8°С, **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И БЕЗОПАСНОСТЬ

**Данный набор предназначен только для диагностики ин-витро! ТОЛЬКО ДЛЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.**

Данный анализ является методом, чувствительным к времени и температуре. Чтобы избежать ложных результатов, строго придерживайтесь процедуры схемы анализа, не изменяя ее.

- Не используйте реагенты с разных лотов или других наборов. Компоненты набора подобраны точно, чтобы обеспечить максимальную результативность анализа.
- Уверьтесь в том, что срок годности реагентов не истек, а также, что они из одного лота. Не используйте реагенты после окончания срока пригодности, указанного на этикетках реагентов или упаковке набора.
- ВНИМАНИЕ – КРИТИЧЕСКИЙ ШАГ:** Все реагенты и образцы необходимо привести к комнатной температуре (18-30°) до начала теста. Слегка встряхните реагент перед использованием, и верните к температуре 2-8°С сразу после использования.
- используйте только достаточное количество образцов, как указано в схеме анализа. В противном случае чувствительность анализа может оказаться очень низкой.
- Не касайтесь внешней стороны дна лунок; отпечатки пальцев или царапины могут препятствовать считыванию.
- При считывании результатов уверьтесь в том, что дно планшета сухое, а внутри лунок нету воздушных пузырьков.
- Никогда не давайте лункам микропланшета высохнуть после промывания. Переходите немедленно к следующему этапу. При добавлении реагентов избегайте образования воздушных пузырьков.
- Избегайте длительных пауз между этапами анализа. Обеспечьте одинаковые рабочие условия для всех лунок.
- Часто калибруйте пипетки, чтобы обеспечить точность дозирования образцов/реагентов. Всегда используйте новые одноразовые наконечники для каждого образца и реагента во избежание перекрестной контаминации. Никогда не пипетируйте растворы ртом. Рекомендуется использование автоматических пипеток.
- Уверьтесь в том, что инкубационная температура внутри инкубатора составляет 37°С.

- Добавляя образцы, избегайте касания наконечника пипетки дна лунки.
- При считывании результатов планшетным ридером, рекомендуется установить абсорбцию при 450нм или при 450 нм со ссылкой на 630 нм.
- Обращайтесь со всеми реагентами и образцами человеческого происхождения как с потенциально инфицированными.
- В наборе могли быть использованы материалы человеческого происхождения. Они тестировались наборами высокой результативности и являются отрицательными к антителам HTLV 1/2, вирусу гепатита С, TP и поверхностному антигену вируса гепатита В. Однако, не существует аналитического метода, способного уверить в полном отсутствии возбудителя инфекции в образцах или реагентах. Поэтому необходимо очень аккуратно обращаться с реагентами и образцами. Строгое соблюдение правил лабораторной практики может обеспечить личную безопасность. Никогда не ежьте, не пейте, не курите и не наносите косметику в лаборатории.
- В данном наборе могла использоваться бычья сыворотка. Альбумин бычьей сыворотки и сыворотка зародыша теленка взяты у животных, проживающих в географических зонах, безопасных по отношению к возможности заражения ГЭ КРС и ТГЭ.
- Перед дальнейшей утилизацией все наконечники для пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры для образцов необходимо собрать и подвергнуть паровой стерилизации на протяжении 1 часа при температуре 121°С, либо же обработать гипохлоритом натрия на протяжении 30 минут с целью обеззараживания.
- Стоп-раствор (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) является сильной кислотой. Едкий. Использовать осторожно. В случае попадания капель на кожу или в глаза, немедленно вытереть или промыть водой. Консервант ProClin 300 может вызывать чувствительность кожи.
- Ферментативная активность конъюгата пероксидазы хрена может пострадать от пыли, реактивных химикатов, растворов типа гипохлорита натрия, кислоты, щелочей и т.д. НЕ проводить анализ в присутствии данных веществ.
- Сертификат безопасности материала доступен по требованию.
- В случае использования полностью автоматизированной системы обработки данных микропланшета, не накрывайте планшет крышкой во время инкубации. Можно также упустить выбивание остатков из планшета после промывания.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

- Подготовка реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°С) за 15-30 минут. Проверьте концентрат промывочного буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°С до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный промывочный буфер **1:20** дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления промывочного буфера.
- Нумерация лунок:** Пометьте три лунки как отрицательный контроль (напр. **B1, C1, D1**), две лунки как положительный контроль (напр. **E1, F1**) и одну как бланк. (**A1** – ни образцы ни HRP-конъюгат не должен добавляться в лунку бланка). Используйте число полосок, необходимое для теста.
- Добавление разбавителя:** Добавьте **100 мкл** разбавителя образца в каждую лунку, кроме лунки бланка, положительного и отрицательного контролей.
- Добавление образца:** Добавьте по **10 мкл** образцов или по **100 мкл** положительного и отрицательного контролей в соответствующие лунки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Смешать осторожным постукиванием планшета.
- Инкубация:** Накройте планшет и инкубируйте **30 минут при 37°С**. Рекомендуется использовать водяной резервуар для поддержания стабильной температуры и влажности во время инкубации. Если используется сухой инкубатор, не открывайте двери часто.
- Промывка:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** промывочным буфером. Каждый раз выдержите лунки **30-60 секунд**. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
- Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
- Инкубация HRP-конъюгата:** Накройте планшет и инкубируйте **30 минут при 37°С**.
- Промывка:** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** промывочным буфером как указано в п. 6.

10. **Закрашивание:** Внесите **50 мкл** хромогена А и **50 мкл** хромогена В в каждую лунку, включая **бланк** и смешайте постукиванием по планшету. Инкубируйте планшет **15 минут** при **37°C**, в темном месте. Ферментативная реакция между растворами хромогенов вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и анти-HCV IgM положительном образце.
11. **Остановка реакции:** Используя многоканальную пипетку или ручную, внесите **50 мкл стоп раствора** в каждую лунку и смешайте постукиванием легко по планшету. В положительном контроле и анти-HCV IgM положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
12. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель лункой бланка и считайте абсорбцию при **450 нм**. Если используется инструмент с двойным фильтром, установите длину волны при **630 нм**. Вычислите величину исключения и оцените результаты (**Примечание:** считайте абсорбцию в течении **5 минут** после остановки реакции).

#### ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Каждый планшет должен приниматься отдельно, несмотря на количество анализируемый планшетов. Результаты вычисляются как отношение ОП образца к величине исключения (СО). Если величина исключения была считана на планшетном считывателе с одним фильтром, результаты необходимо вычислять отниманием ОП лунки бланка от напечатанных величин образцов и контролей. Если считывается на планшетном считывателе с двойным фильтром, не отнимайте ОП лунки бланка от напечатанных образцов и контролей.

#### 1. Вычисление величины исключения (СО) = $Nc \times 0,12$

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

Пример:			
Вычисление Nc:			
№ лунки	B1	C1	D1
ОП отр. контроля	0,014	0,012	0,016
Nc = 0,014			
(Среднее значение ниже 0,02 + 0,12 = 0,14)			
Вычисление величины исключения (СО) = 0,02 + 0,12 = 0,14			

Если один из отрицательных контролей не соответствует спецификации диапазона контроля качества, его необходимо отбросить и вычислить среднее двух оставшихся величин. Если ОП более чем одного контроля не соответствует спецификации диапазона контроля качества, тест неверный и его нужно повторить.

#### 2. Диапазон контроля качества

- Абсорбция бланка ниже 0,080 при 450 нм.
- Абсорбция ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм или при 450 нм после бланкирования.
- Абсорбция ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после бланкирования.

#### 3. Интерпретация результатов:

(S= индивидуальная абсорбция каждого образца)

**Отрицательные результаты (S/CO < 1):** образцы, что дали абсорбцию ниже величины исключения, являются отрицательными в этом анализе, что указывает на отсутствие IgM антител к вирусу гепатита С. Результаты настоящего анализа не должны использоваться в одиночку для подтверждения инфекционного статуса.

**Положительные результаты (S/CO ≥ 1):** образцы с абсорбцией выше или равной величине исключения, принимаются как изначально реактивные, что указывает на присутствие IgM антител к вирусу гепатита С. Рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно реактивные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HCV и поэтому пациенты, возможно, инфицированные вирусом гепатитом С.

**Граничные (S/CO = 0,9-1,1):** Образцы с абсорбцией величины исключения между 0,9 и 1,1 рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на IgM антитела к HCV.

Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой.

#### ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

##### 1. Специфичность

Здоровые доноры крови	К-во	-	+	Подтвержд. положит.	Ошибочно положит.	Специфичность
*Место 1	538	532	6	4	2	99.62%
*Место 2	860	855	5	2	3	99.69%
*Место 3	278	278	0	0	0	100%
ВСЕГО	1676	1763	11	6	5	99.87%

Образцы были испытаны во время рутинного скрининга крови на HCV в трех банках крови в Китае. Все изначально положительные образцы были проверены RIBA, чтобы подтвердить результаты.

##### 1. Чувствительность:

Клин. исследования	К-во	+	Референт. ИФА HCV IgM	Референт. ИФА HCV IgG	Обнаруж. положит. диапазон	Положит. совпадение с реф.ИФА HCV IgG
Острый гепатит С	106	65	66	97	68.9%	98.48%
Хронич. гепатит С	151	128	129	151	85%	99.22%

Референтные анализы: ИФА HCV IgG третьего поколения и коммерчески доступный ИФА HCV IgG.

##### Данные стационарного исследования:

Тип образца	Отриц. контроль	Отриц. образец	Слабо положит.	Средне положит.	Сильно положит.	Положит. контроль
S/CO	0.045	0.238	1.6	5.1	9.27	11.36
CV%	NA	NA	8.2%	5.5%	4.7%	4.5%

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторяемые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Отрицательный результат при определении антитела не исключает возможность инфекции. Антитела могут не определяться во время ранних стадий заболеваний и в некоторых иммунодепрессивных индивидов.
- Если после повторного анализа первично реактивных образцов результаты анализа остаются отрицательными, эти образцы необходимо считать неповторяемыми (ошибочно положительными) и интерпретировать как отрицательные. Как и в других очень чувствительных ИФА, ошибочно положительные результаты могут случаться по нескольким причинам, большинство из которых относятся, но не ограничиваются, к несоответствию промычного этапа.
- Все положительные результаты необходимо подтверждать другими имеющимися методами и интерпретировать, принимая во внимание клиническую информацию о пациенте.
- Распространенные ошибки: закончился срок пригодности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Преобладание маркера влияет на величины анализа.
- Это набор предназначен ТОЛЬКО для анализа отдельно взятых образцов сыворотки или плазмы. Не использовать для анализа трупных образцов, слюны, мочи или других биожидкостей или собранной (смешанной) крови.
- Этот анализ является качественным, его результаты не можно использовать для измерения концентрации антител.

#### УКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ УХУДШЕНИЯ КАЧЕСТВА РЕАГЕНТОВ

- Значения положительного или отрицательного контролей, находящиеся вне указанного диапазона контроля качества, являются указателями возможного ухудшения реагентов и/или качества работы оператора или сбоев оборудования. В таком случае результаты должны считаться недействительными и образцы должны повторно анализироваться. В случае постоянно ошибочных результатов, исходя из ухудшения или нестабильности реагентов, немедленно замените реагенты другими.
- Если после смешивания растворов хромогена А и В в лунках цвет этой смеси в течении нескольких минут становится синим, не продолжайте проведения анализа и замените реагенты свежими.

## ГОДНОСТЬ

Не использовать набор после истечения срока годности,  
указанного на упаковке набора и этикетках реагентов.



### **ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР**

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
е-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)