



Vitrotest[®]

Vitrotest HCV-IgM

Імуноферментна тест-система для виявлення
антитіл класу IgM до вірусу гепатиту С

Інструкція з використання

1. Призначення
2. Клінічне значення
3. Принцип аналізу
4. Матеріали та обладнання
5. Застереження та техніка безпеки
6. Зберігання та стабільність
7. Підготовка зразків
8. Підготовка реагентів
9. Процедура аналізу
10. Облік результатів та їх інтерпретація
11. Діагностичні характеристики тесту
12. Обмеження аналізу

Література

Умовні позначення

IVD

Для in vitro діагностики

REF

TK043

«Vitrotest HCV-IgM»

Імуноферментна тест-система для виявлення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту С

1. Призначення

Імуноферментна тест-система «Vitrotest HCV-IgM» призначена для виявлення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту С у сироватці чи плазмі крові людини.

Тест-набір може бути застосований як для проведення ІФА з використанням автоматичних піпеток та стандартного обладнання, так і для постановки на автоматичному імуноферментному аналізаторі відкритого типу.

Тест-система «Vitrotest HCV-IgM» може бути використана для діагностики первинної інфекції, гострого та хронічного гепатиту С, оцінки ефективності проведеної терапії.

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. При гепатиті С вражається переважно печінка. 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 захворювання є вірус гепатиту С (ВГС) – маленький вкритий оболонкою вірус (50 нм в діаметрі), що містить одноланцюгову РНК, відноситься 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. На сьогоднішній день з метою первинної діагностики вірусного гепатиту С та тестування донорської крові переважно застосовують імуноферментний аналіз для виявлення специфічних до ВГС антитіл. Також виявлення антитіл до ВГС є інформативним для диференційної діагностики гострого та хронічного гепатиту С, а також з метою контролю ефективності противірусної терапії.

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. При гострому гепатиті С IgM специфічні антитіла виявляються у більшості хворих. Низькі титри анти-ВГС IgM антитіл виявляються у 50-80% випадків хронічного гепатиту С, у цих пацієнтів виявлено кореляцію анти-ВГС IgM та біохімічних маркерів захворювання печінки.

В більш ранні строки виявляються IgG антитіла до білків core (c22) та NS3 (c33). У більшості інфікованих першими починають з'являтися антитіла 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 в тест-системах для скринінгу донорської крові використовуються рекомбінантні білки core, NS3, NS4 та NS5.

3. Принцип аналізу

Визначення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту С в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM» базується на принципі «непрямого» твердофазного імуноферментного аналізу.

Твердою фазою в тест-системі є стрипований ІФА-планшет з попередньо засорбованими в лунках рекомбінантними антигенами вірусу гепатиту С core, NS3, NS4. Під час інкубації досліджуваних зразків в лунках ІФА-планшета відбувається зв'язування специфічних до ВГС антитіл з антигенами на твердій фазі. Після відмивання незв'язаних компонентів в лунки додається кон'югат антивидових (специфічних до IgM людини) моноклональних антитіл з пероксидазою хрому, що зв'язується з імуними комплексами на твердій фазі. Незв'язані компоненти відмиваються. Візуалізація утворених імуних комплексів відбувається при внесенні в лунки розчину хромогену ТМБ. В результаті реакції розчин в лунках де утворились імунні комплекси забарвлюється в синій колір. Реакція зупиняється додаванням стоп-реагенту, при цьому синій колір забарвлених лунок змінюється на жовтий. Результат аналізу визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 450/620 нм.

4. Матеріали та обладнання

4.1 Склад набору

ІФА-планшет – 12 стрипів по 8 лунок (з можливістю відокремлення лунок), з іммобілізованими рекомбінантними антигенами вірусу гепатиту С: core, NS3, NS4.

Позитивний контроль – 1 мікропробірка, що містить 0,7 мл розчину специфічних імуноглобулінів з консервантами (рожевий).

Негативний контроль – 1 мікропробірка, що містить 1,8 мл негативної сироватки людини з консервантом (жовтий).

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

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

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

Розчин для промивання Tr100 (20x) – 1 флакон, що містить 50 мл 20-ти кратного концентрату фосфатного буферу з Тритоном Х100 (безбарвний).

Стоп-реагент – 1 флакон, що містить 12 мл розчину 0,5 М сірчаної кислоти (безбарвний).

Клейка плівка – 2 аркуші плівки для заклеювання планшетів під час інкубації

Бланк внесення проб – 1 аркуш для запису схеми внесення зразків

Інструкція – 1 екземпляр інструкції з використання

4.2 Додаткові реактиви, матеріали та обладнання

Для постановки аналізу необхідні такі додаткові реактиви, матеріали та обладнання:

- деіонізована або дистильована вода;
- фільтрувальний папір;
- мірні циліндри на 10, 200 та 1000 мл;
- одноразові рукавички;
- розчин перекису водню 6%;
- одноразовий або чистий посуд для приготування реактивів (флакони та ванночки);
- таймер;
- одно- та багатоканальні автоматичні піпетки змінного об'єму на 20, 200 та 1000 мкл та

наконечники до них;

- термостат на 37 °С;
- контейнер для твердих відходів;
- контейнер для рідких відходів;
- ¹автоматичний або напівавтоматичний промивач планшетів (вошер);
- ²одно- або багатоканальний спектрофотометр (рідер) для мікропланшетів на 450/620-695 нм.

^{1,2} *Будь ласка, проконсультуйтеся з нами щодо адаптації Вашого обладнання.*

5. Застереження та техніка безпеки

5.1. Застереження:

– не використовуйте компоненти тест-системи після закінчення строку придатності;
– не використовуйте під час аналізу та не змішуйте компоненти різних серій та компоненти із тест-систем різних нозологій;

– не використовуйте реактиви інших виробників у поєднанні з наборами Vitrotest™;

Примітка: Розчин для промивання Tr100 (20X), Розчин ТМБ та Стоп-реагент допускається використовувати інших серій, які відрізняються від тих, що вкладені до тест-набору. Ці реактиви використовуються в інших тест-системах виробництва ТОВ „ІВК „Рамінтек“. Будь ласка, проконсультуйтеся з нами для отримання детальної інформації.

– після використання реагенту закривайте кожен флакон своєю кришкою;

– чітко дотримуйтеся режиму промивання планшетів, вказаного в пунктах інструкції;

– під час промивання контролюйте наповнення та повну аспірацію розчину з лунок;

– кожного разу використовуйте новий наконечник піпетки для внесення зразків або реагентів;

– уникайте потрапляння прямих сонячних променів на реактиви тест-системи;

– розчин ТМБ має бути безбарвним або світло блакитним перед використанням, якщо розчин забарвлений в синій або жовтий колір його не можна використовувати. Уникайте контакту розчину ТМБ з металами або іонами металів. Для роботи використовуйте лише чистий, ретельно виполосканий дистильованою водою посуд;

– ні в якому разі не використовуйте один й той же посуд для розчину кон'югату та хромогену.

5.2. Техніка безпеки:

– всі реактиви набору призначені лише для in vitro діагностики;

– постановку аналізу проводити лише у гумових рукавичках;

– не піпетувати розчини ротом;

– позитивним контролем тест-системи «Vitrotest HCV-IgM» є розчин специфічних імуноглобулінів, що не містить антитіл до ВІЛ1/2, Тгеронета pallidum та HBsAg.

– негативний контроль тест-системи «Vitrotest HCV-IgM» протестовано та знайдено негативним на антитіла до ВІЛ1/2, ВГС, Трепонема pallidum та HBsAg, однак поводитись із контролями та досліджуваними сироватками слід як із потенційно небезпечним інфекційним матеріалом;

– рідкі відходи слід інактивувати, наприклад, розчином перекису водню у кінцевій концентрації 6 % упродовж 3 годин при кімнатній температурі, або гіпохлоридом натрію у кінцевій концентрації 5% протягом 30 хвилин, або іншими дезінфікуючими агентами відповідно до інструкції з використання;

– тверді відходи слід інактивувати шляхом автоклавування при 121 °С упродовж 1 години;

– не автоклавуйте розчини, що містять азид натрію або гіпохлорит натрію;

– слід уникати розбризкування розчинів ТМБ та стоп-реагенту, а також їх контакту із слизовими оболонками та шкірою;

– у разі розбризкування розчинів, що не містять кислоти, наприклад, сироваток, обробити поверхню 6 %-м розчином перекису водню, а потім витерти насухо фільтрувальним папером.

6. Зберігання та стабільність

Реагенти тест-системи стабільні протягом строку придатності, вказаного на етикетці, якщо їх зберігати при 2-8 °С.

Транспортувати набір при температурі 2-8 °С. Допускається одноразове транспортування при температурі не вище 20 °С протягом двох діб.

7. Підготовка зразків

Зразки сироватки чи плазми крові можна зберігати при температурі 2-8 °С не більше 3 діб після забору. Допускається більш тривале зберігання зразків замороженими при температурі від -20 до -70 °С. Заморожені зразки перед використанням розморожують та витримують при кімнатній температурі упродовж 30 хвилин. Після розморожування зразки слід перемішати задля досягнення однорідності. Уникайте повторного заморожування-відтаювання досліджуваних зразків. У разі помутніння сироватки (чи плазми) звільняються від нерозчинних включень центрифугуванням при 3000 об./хв. протягом 10-15 хвилин. Не використовуйте зразки сироваток із вираженою ліпідемією, гемолізом, а також бактерійним проростом.

8. Підготовка реагентів

Дуже важливо витримати всі реагенти тест-системи «Vitrotest HCV-IgM» при кімнатній температурі 18-25 °С протягом 30 хвилин перед використанням.

8.1. Підготовка ІФА-планшета

Для попередження конденсації води в лунках відкривайте ІФА-планшет лише після витримання 30 хвилин при кімнатній температурі. Розкрийте вакуумну упаковку, відокремте необхідну кількість лунок, а решту відразу ж ретельно упакуйте та **зберігайте щільно закритим на замок (zip-lock)** при температурі 2-8 °С. Зберігання в такий спосіб упакованого планшета забезпечує його стабільність протягом 3 місяців.

8.2. Розчин для промивання

Флакон містить 50 мл 20х концентрату буферу з детергентом. Для приготування розчину для промивання розведіть концентрат 1:20 (тобто, 1+19) дистильованою або деіонізованою водою, потім перемішайте. Наприклад: на 4 мл концентрату – 76 мл дистильованої води, що достатньо для одного стрипу. У випадку наявності кристалів в концентраті розчину для промивання прогрійте флакон при 37 °С протягом 15-20 хвилин.

Розведений розчин можна зберігати при температурі 2-8 °С не більше 7 діб.

9. Процедура аналізу

9.1. Підготувати необхідну кількість лунок для аналізу (кількість досліджуваних зразків та чотири лунки для контролів), вставити їх в рамку ІФА-планшета. Лунки з контролями обов'язково включати до кожної постановки аналізу.

9.2. Заповнити бланк внесення проб.

9.3. Приготувати розчин для промивання згідно пункту 8.2.

9.4. Внести в усі лунки планшета по 80 мкл розчину для розведення сироваток (PPC).

9.5. Внести в лунки по 40 мкл контролів та досліджуваних зразків: в лунку А1 – позитивний контроль, в лунки В1, С1 та D1 – негативний контроль. В решту лунок – досліджувані зразки. Під час внесення сироваток та контролів обережно піпетуйте суміш – відбувається зміна кольору розчину для розведення сироваток з коричнево-зеленого на блакитний.

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

9.7. По закінченні інкубації обережно зняти клейку плівку та промити лунки п'ять разів з використанням автоматичного промивача або 8-канальної піпетки наступним чином:

– видалити вміст лунок в контейнер для рідких відходів;

– наповнити лунки стрипів не менш ніж по 300 мкл розчином для промивання, залишити не менш як на 30 секунд;

– аспірувати розчин з лунок, залишковий об'єм розчину після аспірації на всіх етапах промивання має складати не більше 5 мкл;

- повторити процедуру промивання ще чотири рази;
- після останньої аспірації позбавитись зайвої вологи, постукуючи планшетом по фільтрувальному паперу.

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

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

9.10. «Розчин ТМБ» є готовим для використання розчином ТМБ-субстрату з перекисом водню. Розчин ТМБ має бути безбарвним, слід запобігати потраплянню сонячного проміння на розчин. Вносити розчин ТМБ слід чистим новим наконечником: обережно відібрати розчин ТМБ з флакону і, не торкаючись дна та стінок лунок планшета, внести по 100 мкл розчину ТМБ в лунки.

9.11. Інкубувати ІФА-планшет протягом 30 хвилин в темному місці при кімнатній температурі 18-25 °С.

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

9.13. Виміряти на рідері оптичну густину в кожній лунці стрипів при довжині хвилі 450/620 нм протягом 5 хвилин після зупинення реакції. Зверніть увагу на чистоту зовнішньої поверхні дна лунок.

Облік результатів аналізу можна проводити в однохвильовому режимі при довжині хвилі 450 нм, в цьому випадку слід залишити лунку для встановлення бланку (в таку лунку вносити лише розчин ТМБ та стоп-реагент).

10. Облік результатів та їх інтерпретація

10.1. Достовірність результатів аналізу:

Розрахувати середнє значення негативного контролю

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

Результати аналізу вважати достовірними, якщо:

- оптична густина (ОГ) позитивного контролю не нижче 1,2 оптичних одиниць (ОО),
- ОГ в лунках з негативним контролем (ОГ K-) не вище 0,15 ОО.

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

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

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

10.2. Облік результатів аналізу.

Рівень граничного значення (Cut off) розрахувати додаючи до середнього значення негативного контролю величину 0,30, тобто

$$Граничне значення = ОГ K_{-середнє} + 0,30.$$

Розрахувати «сіру зону» значень ОГ, що знаходиться до 10 % нижче від граничного значення тест-системи «Vitrotest HCV-IgM», тобто

$$0,9 \times ГЗ \leq Сіра зона \leq ГЗ$$

10.3. Інтерпретація результатів

Зразки із значенням оптичної густини нижче «сірої зони» значень ОГ вважаються **негативними** в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM».

Досліджувані зразки в межах «сірої зони» значень ОГ вважати **невизначеними**. Такі сироватки слід дослідити повторно в двох лунках тест-системи.

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

11. Діагностичні характеристики тесту

11.1. Специфічність та чутливість

Чутливість тест-системи «Vitrotest HCV-IgM» оцінювали з використанням 93 зразків сироваток людей хворих на гострий та хронічний гепатит С. Використані сироватки містили РНК вірусу гепатиту С та антитіла класу IgM до ВГС, що було підтверджено в двох комерційних тест-системах для визначення антитіл класу IgM до ВГС. Тест-набором «Vitrotest HCV-IgM» всі зразки були виявлені позитивними.

При дослідженні специфічності тест-набору «Vitrotest HCV-IgM» з використанням 273 сироваток, негативних на антитіла до вірусу гепатиту С не було виявлено хибнопозитивних результатів.

11.2. Точність

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

Коефіцієнт варіації (CV) для двох сироваток з різним рівнем специфічних антитіл оцінювали в 32 повторях на двох серіях тест-систем.

№ сироватки	ОГ	CV ₁ , %	CV ₂ , %
903	0,796	6,2	6,8
451	1,524	5,8	5,4

Відтворюваність результатів між різними постановками аналізу (Inter assay reproducibility)

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

№ сироватки	ОГ	CV, %
903	0,835	7,9
451	1,479	6,2

12. Обмеження аналізу

Позитивний результат в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM» є свідченням наявності у пацієнта антитіл класу IgM специфічних до вірусу гепатиту С, які продукуються організмом при інфікуванні вірусом гепатиту С.

Негативний результат в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM» показує, що протестований зразок не містить антитіл класу IgM до вірусу гепатиту С, або концентрація специфічних антитіл нижче межі чутливості аналізу.

Для діагностики гострого та хронічного гепатиту С, оцінки ефективності терапії рекомендується додатково провести дослідження зразка на наявність анти-ВГС IgG антитіл (наприклад, з використанням тест-системи «Vitrotest HCV-IgG», «Vitrotest Anti-HCV different»), РНК ВГС та оцінити біохімічні показники сироватки крові.

Остаточний діагноз може бути встановлено лише з урахуванням клінічних проявів та даних комплексу лабораторних досліджень.

Література

1. Михайлов М.И. Лабораторная диагностика гепатита С. (Серологические маркеры и методы их выявления. // Вирусные гепатиты. Достижения и перспективы Инф.бюллетень. – 2001. - №2.(12). – с.8-18.
2. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты в клинической практике. СПб:Теза. - 1996. – 290 с.
3. 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.
4. 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 orthotopic liver transplantation. // Journal of Clinical Microbiology. - 1999. – V.37. – N.8. – P.2726-2728.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

Умовні позначення

Інтерпретація умовних символів:

	«Медичний виріб для діагностики <i>in vitro</i> »
	«Код партії»
	«Номер за каталогом»
	«Дата виготовлення»
	«Використати до»
	«Температурне обмеження»
	«Містить достатньо для (n-) випробувань»
	«Берегти від прямих сонячних променів»
	«Увага, дивись інструкцію з використання»
	«Виробник»
	«Ознайомлення з інструкціями для застосування»

З питаннями та побажаннями щодо роботи набору звертайтеся до виробника:



Товариство з обмеженою відповідальністю «Іноваційно-виробнича компанія «Рамінтек»
03039 Україна, м. Київ, пр-т 40-річчя Жовтня, 7, оф. 227 (юридична адреса)
07300 м. Вишгород, Київська обл.. вул. Шолуденка, 19 (фактична адреса)
тел. +380 44 222-76-72

Схема проведення аналізу в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM»

Витримати реагенти 30 хв. при 18-25 °С

Приготувати розчин для промивання планшета, розвести 20х концентрат розчину для промивання *Tr100* очищеною водою 1:20 (тобто, 1+19). Наприклад, 4 мл розчину + 76 мл води

Заповнити бланк внесення проб для аналізу

В лунки планшета внести по 80 мкл розчину для розведення сироваток

Внести по 40 мкл досліджуваних зразків та контролів в лунки:

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

E1 та решта лунок – досліджувані зразки

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

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

Промити лунки 5 разів

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

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

Промити лунки 5 разів

В лунки стрипів внести по 100 мкл розчину ТМБ-субстрату

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

В лунки стрипів внести по 100 мкл стоп-реагенту

Виміряти оптичну густина в лунках на спектрофотометрі при 450/620 нм

Розрахувати граничне значення (ГЗ) в тест-системі «Vitrotest HCV-IgM» за формулою

$$ГЗ = ОГ K_{\text{середнє}} + 0,30$$

Провести облік результатів аналізу згідно таблиці

Значення оптичної густини

> ГЗ

$0,9 \times ГЗ \leq ОГ \leq ГЗ$

< $0,9 \times ГЗ$

Результат

позитивний

невизначений

негативний