



ТЕСТ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ IgG АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

Кат. №: 4372 (GARLHC004EN)
Производитель: Mikrogen Diagnostik (Германия)

Версия от 11-2011

1 ПРИМЕНЕНИЕ

Тест-система для качественного определения IgG антител к вирусу гепатита С (HCV) в человеческой сыворотке или плазме.

2 НАЗНАЧЕНИЕ

Данная тест-система recomLine HCV IgG основана на методе иммуноблота. В отличие от метода ИФА (ELISA), принцип метода позволяет выполнять определение специфических антител к различным антигенам HCV (ядерному 1, ядерному 2, хеликазе, NS3, NS4, NS5) за счет использования отдельных бендов отдельных антигенов.

Данный метод recomLine HCV IgG является подтверждающим тестом и может быть использован для подтверждения сомнительных результатов скрининга.

3 ПРИНЦИП ТЕСТА

Используемые высокочистые рекомбинантные антигены HCV нанесены на нитроцеллюлозную мембрану.

1. В ходе анализа стрипы инкубируют с разведенными образцами сыворотки или плазмы человека. Если специфические антитела присутствуют в образце, то во время инкубации они связываются с антигенами, фиксированными на стрипе.
2. Несвязавшиеся компоненты удаляются при промывке.
3. На втором этапе стрипы инкубируют с антителами к IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена.
4. Несвязавшийся конъюгат удаляется при промывке.
5. Специфически связанные антитела выявляют с помощью цветной реакции, добавляя субстрат, взаимодействующий с пероксидазой хрена. Проявляющиеся темные полосы в соответствующем антиген-антитело. В качестве контроля реакции выступают бенды, расположенные параллельно один за другим на верхнем краю стрипа:
 - a) Бенд контроля реакции, под номером стрипа, реакция должна присутствовать для любого образца сыворотки/плазмы.
 - b) Бенд контроля конъюгата IgG: этот бенд служит контролем выявления антител. Если стрип использован для выявления IgG антител, бенд контроля конъюгата IgG должен быть четко виден.
 - c) "Контроль Cut-off": для контроля реакции окрашивания и оценки стрипа. Интенсивность этого бенда является базовой для оценки реактивности антител как положительной, так и отрицательной (см. раздел 9.2 Оценка результатов).

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Состав набора

В состав набора входят реагенты для проведения 20 определений. Каждый набор содержит:

100 мл Буфер для промывок А (концентрат, 10х)	Содержит фосфатный буфер, NaCl, KCl, детергент и консерванты MIT (0,1%) и оксипирон (0,2%)
40 мл Раствор субстрата ТМБ (готов к использованию)	
5 г Сухое молоко (пудра)	
1 штука Инструкция по использованию	
2 штуки Оценочная форма	
2 штуки Пробирки с 10 последовательно пронумерованными тест-стрипами, покрытыми рекомбинантными антигенами Bordetella	
500 мкл Конъюгат антител к IgG человека (концентрат, 100х, флакон с зеленой крышкой), кроличьи, содержит NaN ₃ (<0,1%), MIT (0,1%) и оксипирон (0,2%)	
140 мкл Положительный контроль IgG, сыворотка (красная крышка). Человеческого происхождения, анти-HIV1/2 и HBsAg отрицательный, содержит MIT (0,1%) и	

	оксипирон (0,1%)
	140 мкл Отрицательный контроль IgG, сыворотка (голубая крышка). Человеческого происхождения, анти-HCV, анти-HIV1/2 и HBsAg отрицательный, содержит MIT (0,1%) и оксипирон (0,1%)

4.2 Необходимые, но не поставляемые реагенты и оборудование

- Лотки для инкубации (могут быть заказаны у производителя MIKROGEN GmbH)
- Деионизированная вода
- Пластиковые пинцеты
- Горизонтальный шейкер Вортекс
- Вакуумный насос или аналог
- Градуированные цилиндры, на 50 мл и на 1000 мл
- Пипетки со сменными одноразовыми наконечниками, на 20 мкл и на 1000 мкл
- Пипетка или диспенсер на 10 мл
- Таймер
- Фильтровальная бумага
- Защитные лабораторные перчатки
- Контейнер для биологически опасных отходов

5 ИНФОРМАЦИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

- Храните реагенты до и после использования при 2-8°C, не замораживайте. Выдержите все компоненты перед началом теста по крайней мере 30 минут при 18- 25°C (комнатная температура). И анализ и инкубация производятся при комнатной температуре.
- Идентичные реагенты (согласно символам, напечатанным на этикетках) во всех наборах recomLine-, recomBlot и ImmunoBlot могут быть использованы вне зависимости от параметра или лота. Пожалуйста, учитывайте срок годности компонентов.
- Перед использованием хорошо перемешайте концентраты реагентов и образцы сывороток пациентов.
- Не открывайте пробирку со стрипами до момента начала анализа для того, чтобы избежать конденсации воды. Не использованные стрипы необходимо вернуть в пробирку и хранить при 2-8°C (плотно закрывайте пробирку – стрипы не должны увлажняться до использования!).
- Стрипы последовательно пронумерованы и помечены иконкой соответствующего теста.
- Гарантия качества может быть дана только до окончания срока годности набора.
- Защищайте компоненты набора от попадания прямого солнечного света при хранении и во время выполнения анализа. Раствор субстрата (ТМБ) особенно чувствителен к свету.
- Тестирование должно проводиться хорошо обученным, высококвалифицированным персоналом.
- В случае существенных отличий в продукте или инструкции по применению, применимость теста может отличаться от заданной производителем (MIKROGEN).
- Перекрестная контаминация образцов или конъюгатов может привести к ошибочным результатам. Внесите образцы, стрипы и раствор конъюгата аккуратно. Убедитесь, что инкубируемый раствор не переливается из лунки в лунку. Сливайте жидкость аккуратно!
- Во время анализа стрипы все время должны быть влажными и должны быть полностью погружены в жидкость.
- Возможна автоматизация анализа, за более подробной информацией, пожалуйста, обращайтесь к производителю (MIKROGEN).

6. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

- Только для диагностики in vitro.
- Со всеми материалами, содержащими компоненты крови, необходимо обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
- При изготовлении стрипов были использованы лизаты инaktivированных клеток, бактериальные или вирусные антигены.
- После внесения образцов или контролей стрипы должны считаться инфекционными и с ними необходимо обращаться соответственно.
- Во время выполнения анализа необходимо одевать лабораторные перчатки.
- Реагенты содержат антимикробные агенты и консерванты, азид натрия, MIT (метилизотиазолин), оксипирон и хлорацетамид, перекись водорода. Не допускайте контакта с кожей и

слизистыми. Азид натрия может образовывать взрывоопасные азиды при контакте с металлами, такими как медь и свинец.

- Все жидкие отходы необходимо собирать в контейнер для отходов, содержащий дезинфектант, для инактивации человеческих патогенов. Все реагенты и материалы, контактировавшие с потенциально инфекционно опасными образцами необходимо обработать дезинфектантами и утилизировать в соответствии с установленными гигиеническими требованиями.
- Используйте лотки для инкубации только один раз.
- Обращайтесь со стрипами аккуратно, используйте пластиковые пинцеты.
- Не заменяйте и не смешивайте реагенты набора с реагентами других производителей.
- Внимательно прочтите инструкцию, прилагаемую к набору, перед проведением анализа и тщательно соблюдайте все данные в ней указания. Отклонения от описанного в инструкции протокола может привести к получению ошибочных результатов.

7 ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

7.1 Материал образцов

Для анализа может быть использована сыворотка или плазма (ЭДТА, гепарин, цитрат), которая отделена от сгустка как можно быстрее после сбора образца. Избегайте гемолиза. Во всех случаях необходимо предотвращать микробную контаминацию образцов.

Нерастворимые частицы необходимо перед анализом удалять центрифугированием.

Использование образцов с гемолизом, липемией, желтухой, образцов, инактивированных нагреванием, мутных образцов не рекомендуется.

Важно!

Если анализ не может быть проведен немедленно, то образцы могут храниться до 2 недель при 2-8 °С. Более длительное хранение проб возможно при -20 °С или ниже. Не рекомендуется повторное замораживание-оттаивание образцов, так как это может повлиять на качество результатов теста.

7.2 Реагенты

7.2.1 Приготовление готового к использованию буфера А для промывок

Этот буфер используется для разведения образцов, конъюгата, а также для промывок.

Перед приготовлением раствора рассчитайте объем буфера, необходимый для того количества тестов, которое будет выполняться.

Сначала сухое молоко (пудра) разводится в концентрате буфера для промывок, а затем эта смесь доводится деионизированной водой до конечного объема (разведение: 1 + 9). В таблице приведены необходимые количества/объемы. Если необходимое количество стрипов не указано в таблице, то требуемый объем можно рассчитать.

Реагент	Формула	Пример: 5 стрипов
сухое молоко (пудра) [г]	= кол-во стрипов x 0.1	0.5 г
концентрат буфера А для промывок [мл]	= кол-во стрипов x 2	10 мл
Деионизированная вода [мл]	= кол-во стрипов x 18	90 мл
Готовый буфер А для промывок [мл]	= кол-во стрипов x 20	100 мл

Готовый к использованию промывочный буфер А может храниться при 2 °С - 8°С в течение 4 недель. Готовый к использованию промывочный буфер А слегка мутный и без запаха.

7.2.2 Приготовление раствора конъюгата

Раствор конъюгата должен быть приготовлен непосредственно перед использованием. Готовый к использованию раствор конъюгата хранить нельзя.

Одну часть концентрата конъюгата разводят в 100 частях готового к использованию промывочного буфера А (1 + 100).

Необходимый объем для определенного количества стрипов можно рассчитать как указано в таблице.

Реагент	Формула	Пример: 5 стрипов
концентрат конъюгата [мкл]	= кол-во стрипов x 20	100 мкл
готовый к использованию промывочный буфер А [мл]	= кол-во стрипов x 2	10 мл

Объемы рассчитаны без учета «мертвого» объема. В зависимости от способа постановки анализа (ручной или автоматический) необходимо приготовить объем раствора конъюгата на дополнительные 1-3 стрипа.

8 ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

№	Использование	Примечание
1	Выдержите все компоненты перед началом теста по крайней мере 30 минут при 18-25 оС (комнатная температура)	И анализ и инкубация производятся при комнатной температуре
2	<u>Подготовить тестовые полоски</u> Поместить полоски в 2 мл готового к использованию Буфера А для промывок	Не брать полоски руками – использовать щипцы. Для каждой полоски требуется лунка (см. п. 4.2). Стрип должен быть полностью увлажнен и погружен в промывочный буфер А.
3 а)	<u>Инкубация образцов</u> внесите по 20 мкл неразведенного образца (человеческая сыворотка или плазма) в выбранные ячейки (разведение 1 + 100). Запишите номера образцов в таблице оценки результатов.	Вносите образец с одной стороны погруженного стрипа, в промывочный буфер А, и как можно быстрее аккуратно перемешайте содержимое ячеек шейкированием Накройте лоток для инкубации пластиковой крышкой и поместите в шейкер
б)	Инкубируйте в течение 3 часов при комнатной температуре при осторожном встряхивании	
4	<u>Промывка</u>	Повторите шаг 8.4а-8.4с в общей сложности <u>три раза</u> Избегать перекрестного загрязнения Избегать перекрестного загрязнения. В случае использования автоматического оборудования следуйте инструкциям производителя оборудования
а)	После инкубации аккуратно снимите с лотка крышку	
б)	Тщательно и аккуратно отберите растворы из реакционных ячеек	
с)	Затем внесите 2 мл готового к использованию буфера А для промывок в каждую ячейку и промойте на шейкере при аккуратном встряхивании в течение 5 минут. После окончания процедуры аспирируйте промывочный буфер	
5	<u>Инкубация с конъюгатом</u> После промывки стрипов внесите по 2 мл свежеприготовленного раствора конъюгата в каждую ячейку и инкубируйте 45 минут при комнатной температуре при осторожном встряхивании	Накройте лоток для инкубации пластиковой крышкой и поместите в шейкер
6	<u>Промывка</u> (См. п. 8.4)	Повторите шаг 8.4а-8.4с в общей сложности <u>три раза</u>
7	<u>Реакция с субстратом</u> Внесите 1,5 мл раствора субстрата в каждую ячейку и инкубируйте 8 минут под визуальным контролем при комнатной температуре при осторожном встряхивании	
8	<u>Остановка реакции</u> Быстро промойте стрипы деионизированной водой три раза	
9	<u>Высушивание стрипов</u> Используя пластиковый пинцет, аккуратно извлеките стрипы из воды и поместите их между двумя слоями фильтровальной бумаги, для высухания, приблизительно на 2 часа	Стрипы следует хранить в защищенном от воздействия света месте
Важно!		

Убедитесь в том, что инкубационный раствор не переливается из одной ячейки в другую; не допускайте разбрызгивания при закрывании-открывании крышки (риск контаминации)

9 РЕЗУЛЬТАТЫ

Внимание:

Пожалуйста, не используйте автоматическую интерпретацию без учета рекомендаций по интерпретации, приведенных ниже.

9.1 Контроль качества

Тест может считаться достоверным, если выполнены следующие критерии:

1. Бенд контроля реакции (верхняя линия) ярко выражена, темный бенд
2. Класс антител (второй бенд): бенд контроля конъюгата IgG должен иметь четкую цветную реакцию.
3. Контроль cut-off (четвертый бенд): слабое, но ясно видимое окрашивание.

Лот-специфическая реактивность бендов отрицательного и положительного контролей указана в инструкции, поставляемой с контролями.

Отрицательный и положительный контроли могут быть заказаны дополнительно у производителя MIKROGEN (см. раздел 4.1 данной инструкции).

9.2 Оценка результатов

Программное обеспечение для интерпретации результатов тестирования: gesomScan

Программа gesomScan предназначена для поддержки интерпретации результатов тестирования gesomLine HCV IgG.

Дополнительная информация доступна от производителя MIKROGEN по запросу.

9.2.1 Оценка интенсивности бэндов

1. На прилагаемом бланке запишите дату, партию и номер пробирки со стрипами и выявляемый класс антител.
2. Внесите идентификационные номера образцов в таблицу.
3. С помощью клеевого карандаша прикрепите стрипы в соответствующие поля таблицы. Для этого поместите стрипы реакционной контрольной полосой на проведенные линии. Затем используйте прозрачную клейкую ленту для того, чтобы прикрепить стрипы слева от линии. Полное приклеивание стрипа клеем или адгезивной пленкой может привести к абберациям в окрашивании.
4. Идентифицируйте бенды тестируемого стрипа с помощью контрольного стрипа, напечатанного на бланке и запишите их в протокол. Определите бенды на тестируемом стрипе отдельно для соответствующего класса иммуноглобулинов.

Таблица 1. Оценка интенсивности бэндов по отношению к cut-off бенду

Бэнды	Интенсивность
Нет реакции	-
Очень слабая интенсивность (интенсивность слабее, чем бэнд cut-off)	+/-
Слабая интенсивность (интенсивность такая же, как бэнд cut-off)	+
Сильная интенсивность (сильнее, чем бэнд cut-off)	++
Очень сильная интенсивность	+++

9.3 Результаты теста и интерпретация

Критерии интерпретации результатов анализа приведены в таблице 2.

Таблица 2: Критерии интерпретации результатов результат критерий отрицательный

Результат теста	Критерии
Отрицательный	<ul style="list-style-type: none"> • Нет антигенов \geq «cut-off» <u>или</u> • Изолированные NS3, NS4 или NS5 \geq «cut-off»
Сомнительный	<ul style="list-style-type: none"> • Изолированный ядерный антиген 1 \geq «cut-off» <u>или</u> • Изолированный ядерный антиген 2 \geq «cut-off» <u>или</u> • Изолированный бенд хеликазы \geq «cut-off» <u>или</u> • Хеликазы и один белок NS (NS3, NS4 или NS5) \geq «cut-off» <u>или</u> • Любые два других антигена \geq «cut-off»

Положительный	<ul style="list-style-type: none"> • Ядерный антиген 1 и ядерный антиген 2 \geq «cut-off» <u>или</u> • Ядерный антиген 1 и один дополнительный антиген \geq «cut-off» <u>или</u> • Ядерный антиген 2 и один дополнительный антиген \geq «cut-off» <u>или</u> • Любые три других антигена \geq «cut-off»
---------------	---

10 ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

- Результаты серологических исследований всегда должны интерпретироваться только в контексте клинической картины больного. Терапевтические последствия серологических исследований всегда должны быть определены только в совокупности со всеми клиническими данными.
- Отрицательный результат тестирования данным методом не исключает наличия инфекции HCV. В частности на очень ранней стадии инфекции антител может еще не быть или их уровень может не определяться. Рекомендуется выполнить повторное взятие образцов и тестирование через 2 недели, при подозрении на инфекцию HCV и отрицательных и/или сомнительных результатах первого тестирования.
- У пациентов, проходящих гемодиализ, анти-HCV могут не выявляться, несмотря на положительные результаты анализа HCV-PHK (Hinrichsen et al., 2002; Bukh et al., 1993).
- Повторное взятие (через 3-4 недели) образцов и тестирование должно всегда выполняться при получении сомнительных результатов. Рекомендуется выполнять тестирование методом (RT-) ПЦР (в реальном времени) для выявления генома HCV.
- Изолированная NS5 реактивность наблюдается у пациентов с недавней инфекцией EBV. При неясном анамнезе рекомендуется исключить инфекцию EBV.
- Не существует корреляции между положительными результатами и инфективностью.
- Тёмные окрашенные стрипы: некоторые образцы сывороток могут генерировать общее темное или неравномерное окрашивание всего нитроцеллюлозного стрипа (например, образцы сывороток пациентов с аллергией на белки молока). Это может быть вызвано различными факторами, присутствующими в сыворотке. Оценка таких стрипов обычно возможна только с определенными ограничениями. Например, «инверсия» бендов (белые полосы на темном фоне) оценивается как негатив. Такие образцы сыворотки строго рекомендуется протестировать еще раз с использованием других серологических методов.

11 ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА

11.1 Диагностическая чувствительность

recomLine HCV IgG	HCV* (n=419)
Отрицательный	0
Сомнительный	1
Положительный	418
Специфичность	(1+418)/419=100%**

* включая образцы генотипов 1,2,3,4,5 и 6.

** включая один пограничный результат.

11.2 Сероконверсия

15 панелей образцов с сероконверсией, в общей сложности 123 образца были протестированы данным методом gesomLine HCV IgG, и было выполнено прямое сравнение с результатами другого подтверждающего теста. В трех панелях метод gesomLine HCV IgG выявил антитела к HCV ранее, чем другой тест. В трех панелях метод gesomLine HCV выявлял реактивность позднее, чем другой тест. В оставшихся 9 панелях оба использованных подтверждающих теста выявляли антитела к HCV одновременно.

11.3 Диагностическая специфичность

gesomLine HCV IgG	Доноры крови (n=297)	Клинические образцы* (n=229)	Образцы с потенциально interfering веществами ** (n=68)
Отрицательный	291	224	68
Сомнительный	6	5	0
Положительный	0	0	0
Специфичность	291/297=98,0%	224/229=97,8%	68/68=100%

* Образцы взяты у пациентов с другими вирусными гепатитами,

недавней EBV или CMV инфекцией, аутоиммунными заболеваниями, HIV, сифилисом, желтой лихорадкой и клещевым энцефалитом, беременных женщин, случайно взятые рутинные образцы из лаборатории.

** Образцы с липемией, гемолизом, желтухой, РФ- положительные образцы, образцы взятые у пациентов с гипергаммаглобулинемией.

11.3 Аналитическая специфичность

Аналитическая специфичность определена как способность теста точно определять аналиты в присутствии потенциально интерферирующих веществ в матриксе образца или наличие перекрестной реакции с потенциально интерферирующими антителами.

а) Интерференция: контрольные исследования потенциально интерферирующих факторов показали, что на результаты анализа данным методом не влияют антикоагулянты (цитрат натрия, ЭДТА, гепарин), гемолиз (до 1000 мг/дл гемоглобина), липемия, билирубинемия (до 20 мг/дл билирубина) или глубокое замораживание и оттаивание образцов.

б) Перекрестная реакция: были проведены контрольные исследования потенциально интерферирующих антител к инфекционным агентам со схожими симптомами заболевания (EBV CMV, другие вирусные гепатиты), а также к другим патогенам (вирус клещевого энцефалита, вирус желтой лихорадки). Кроме того, были протестированы клинические состояния, связанные с атипичной активностью иммунной системы (антиядерные антитела, ревматоидный фактор, беременность, инфекция EBV, CMV). Было показано отсутствие перекрестной реактивности (см. раздел 11.3).

ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

ООО «ДИАМЕБ»

ООО «БиоТехЛаб-С»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 612

e-mail: www.diameb.ua

www.biotechlab-s.com.ua