



## НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА С

Кат. номер : 1707-12  
Количество : 96  
Производитель : DAI (США)

Методика 19-04-2012

**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Этот набор является иммуноферментным набором для качественного определения 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

Вирус гепатита С (HCV) является оболочковый, одно цепной положительный чувствительный RNA (9.5 kb) вирус, что принадлежит к семейству флавивирусов. Идентифицированы шесть основных генотипов и серий субтипов HCV. Выделенный в 1989, HCV сейчас распознается как основной возбудитель распространения ассоциированных не-А, не-В гепатитов. Заболевание характеризуется как острая и хроническая форма, хотя 50% инфицированных индивидов развивали несколько жизни опасных хронических гепатитов с циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой. После начала использования в 1990 анти-HCV исследования доноров крови, случаи этой инфекции при переливании крови значительно уменьшились. Первое поколение HCV ELISA показали ограниченную чувствительность и специфичность и были произведены при использовании рекомбинанта дополнительных протеинов к NS4 (c100-3) области генома HCV в качестве антигена. Следующее поколение тестов, что включали рекомбинант / синтетический антигены из ядерного (c22) и неструктурной области NS3 (c33c, c100-3) и NS4 (c100-3, c200) показали значительное улучшение чувствительности и специфичности. Клинические изучения показали значительное число HCV инфицированных индивидов, что развивали антитела к NS5 неструктурному протеину вируса. Для этого третье поколение тестов включали антигены из NS5 области вирусного генома в дополнение к NS3 (c200), NS4 (c200) и ядерному (c22). Третье поколение тестов улучшили чувствительность и уменьшили время между инфицированием HCV и появлением определяемых антител до 60 дней.

### ПРИНЦИП АНАЛИЗА

Этот набор использует твердую фазу, непрямой ELISA анализ для определения антител к HCV в двух шаговой инкубационной процедуре. Полистироловые микролуночки предварительно покрыты рекомбинантом, высоко иммунореактивными антигенами, относящимся к ядерному и неструктурной области HCV (третье поколение HCV ELISA). Во время первой инкубации, анти-HCV специфические антитела, если присутствуют, связываются с твердой фазой предварительно привитых HCV антигенов. Луночки промываются для удаления несвязанных протеинов сыворотки, и добавляются кроличьи анти-человеческие IgG и IgM антитела (анти-IgG/IgM) конъюгированные пероксидазой хрена. Во время второй инкубации эти HRP-конъюгированные антитела связываются к антиген-антитело комплексом, предварительно сформированному, и несвязанный HRP-конъюгат потом удаляется промыванием. В луночки добавляется раствор хромогена, содержащий TMB и перекись мочевины и при присутствии антиген-антитело-анти-IgG/IgM (HRP) иммунокомплекса, бесцветный хромоген гидролизуется связанным HRP конъюгатом до продукта голубого окраса. Голубой окрас изменяется на желтый при остановки реакции серной кислотой. Количество окраса измеряется и пропорционально количеству антитела в образце. Луночки, содержащие образцы отрицательные к анти-HCV антителам остаются бесцветными.

#### Схема принципа анализа: непрямой ELISA

(См. в оригинале инструкции).

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. **Сбор образцов:** Для этого анализа может использоваться и свежая сыворотка и плазма. Кровь, собранная венопункцией, должна стуситься природным путем. Необходимо проследить, что б 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.

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

### СПЕЦИАЛЬНЫЕ ИНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПРОМЫВКИ

1. Правильная процедура промывания важна для корректных и точных данных.
2. Поэтому рекомендуется использовать ELISA микропланшетный вошер хорошего качества. В основном требуется не менее 5 моющих циклов при 350-400 мкл на лунку для предотвращения фальшиво положительной реакции.
3. Для предотвращения загрязнения планшета образцом или HRP-конъюгатом не выбрасывайте содержимое лунок, а дайте возможность планшетному вошеру автоматически аспирировать его.
4. Мы рекомендуем калибровать вошер. Для подтверждения аналитических характеристик. Убедитесь, что каналы для внесения не заблокированы и не загрязнены, что вносится достаточное количество объема, мощного буфера.
5. 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.
6. При аспирации жидкости из лунок, ее необходимо обрабатывать раствором гипохлорида натрия при концентрации 2,5% 24 часа, перед выливанием жидкости.
7. 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 моющего буфера. Если не будет использоваться целый планшет, приготовьте кратный объем моющего буфера.

### МАТЕРИАЛЫ И КОМПОНЕНТЫ

#### Поставляемые материалы

- **Микролуночные стрипы**, зафиксированные в белом держателе стрипов. Планшет запечатан в алюминиевом пакете с осушителем.  
12 8-луночных стрипов на планшет.  
Каждая ячейка содержит рекомбинант HCV антигенов. Микролуночные стрипы могут использоваться раздельно. Поместите неиспользованные луночки в пластиковый пакет с осушителем и храните при 2-8°C.
- **Отрицательный контроль, 1 фл.**  
Голубая жидкость в флаконе с зеленой крышкой  
0,2 мл в флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, тестированный на не-реактивность к HCV антителам.  
Консерванты: 0,1% Проклин 300  
Поставляется готовым к использованию. После вскрытия, стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Сыворотка положительного контроля, 1 фл**  
Красная жидкость в флаконе с красной крышкой  
0,2 мл в флаконе  
анти-HCV IgG/IgM антитела, разбавленные в протеин стабилизирующем буфере, содержащем консерванты: 0,1 % Проклин 300  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Разбавитель образцов, 1 фл**  
Голубая жидкость в белом флаконе с голубой крышкой  
13 мл в флаконе  
Протеин-стабилизирующий буфер, казеин и раствор сахарозы  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **HRP-конъюгат реагент, 1 фл.**  
Красная жидкость в белом флаконе с красной крышкой  
13 мл в флаконе  
Кроличьи анти-человеческие IgG антитела, конъюгированные пероксидазой хрена  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильны 1 месяц при 2-8°C.
- **Промывочный буфер, 1 бут.**  
**Разбавить перед использованием**  
Бесцветная жидкость  
50 мл в бутылке  
PH 7,4, 20 x PBS (содержащий твин 20 в качестве детергента)

Концентрат необходимо разбавить 1:20 дистиллированной / деионизированной водой перед использованием. После разбавления, стабильна одна неделя при комнатной температуре или две недели при 2-8°C.

- **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 стабильна 1 месяц при 2-8°C.
- **Раствор хромогена В, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в черном флаконе с черной крышкой  
8 мл в флаконе  
ТМВ раствор, ТМВ растворенный в лимонной кислоте  
Готовый к использованию. После вскрытия стабильна 1 месяц при 2-8°C.
- **Стоп раствор, 1 фл.**  
Бесцветная жидкость в белом флаконе с желтой крышкой.  
8 мл в флаконе  
Разбавленная серная кислота (0,2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Готовый к использованию
- **Полиэтиленовый пакет, 1 шт.**  
Для неиспользуемых стрипов
- **Картон для накрытия планшета, 2 листа**  
Для накрытия планшета во время инкубации и предотвращения испарения и загрязнения
- **Инструкция, 1 копия**

#### Требуемые, но не поставляемые материалы

1. Свежая дистиллированная или деионизированная вода
2. Одноразовые перчатки и часы
3. Контейнер для отходов.
4. Сменный лоток V-формы.
5. Система для внесения и/или пипетка (одно- или многоканальная), одноразовые наконечники.
6. Абсорбирующая ткань или чистое полотенце.
7. Сухой инкубатор или водяная баня, 37±0,5°C.
8. Микрошейкер для растворения и смешивания конъюгата с образцами.
9. Микропланшетный считыватель, одна длина волны 450 нм или двойная длина волны 450 и 630 нм.
10. Микропланшетная система для аспирации / промывания.

#### ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

1. **Приготовление реагентов:** Приведите реагенты к комнатной температуре (18-30°C) за 15-30 минут. Проверьте концентрат моющего буфера, нет ли солевых кристаллов. Если кристаллы образовались, растворите их нагреванием при 37°C до полного растворения кристаллов. Разбавьте исходный промывочный буфер 1:20 дистиллированной или деионизированной водой. Используйте только чистые пробирки для разбавления моющего буфера.
2. **Число лунок:** Поместите необходимые полоски в держатель, что включают лунки для трех отрицательных контролей (например, **B1, C1, D1**), двух положительных (напр., **E1, F1**) и одного бланка (**A1**, в эту лунку не добавляются ни образцы, ни HRP-конъюгат). Если результаты будут определяться при использовании двойной длины волны, использование бланка можно пропустить. Используйте только необходимое число полосок.
3. **Добавление разбавителя:** Добавьте **100 мкл** разбавителя образца в каждую лунку, кроме лунки бланка.
4. **Добавление образца:** Добавьте **10 мкл** положительного контроля, отрицательного контроля и образца в соответствующие лунки. **Примечание: используйте разные наконечники для каждого образца, отрицательного контроля и положительного контроля для предотвращения перекрестного загрязнения.** Смешайте легким постукиванием по планшету.
5. **Инкубация (1):** Накройте планшет и инкубируйте **30 минут при 37°C**. Рекомендуется использовать водяной резервуар для поддержания стабильной температуры и влажности во время инкубации. Если используется сухой инкубатор, не открывайте двери часто.
6. **Промывание (1):** После окончания инкубации, выньте и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** моющим буфером. Каждый раз выдержите лунку 30-60 секунд. После конечного промывания переверните планшет на бумажное полотенце и постучите по планшету для удаления жидкости.
7. **Добавление HRP-конъюгата:** Добавьте **100 мкл** HRP-конъюгата в каждую лунку кроме бланка.
8. **Инкубация HRP-конъюгата (2):** Накройте планшет накрывателем и инкубируйте **30 минут при 37°C**.

9. **Промывание (2):** После окончания инкубации, удалите и выбросьте накрыватель. Промойте каждую лунку **5 раз** разбавленным моющим буфером как в **этапе 6**.
10. **Образование окраса:** 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. Энзимная реакция между хромогеном А/В вырабатывает голубой окрас в положительном контроле и анти-HCV 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 положительном образце развивается интенсивный желтый окрас.
12. **Измерение абсорбции:** Откалибруйте планшетный считыватель бланком 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 порогового значения (CO) = \*Nc+0,12

\*Nc – средняя абсорбция трех отрицательных контролей

**Важно: Если средняя ОП отрицательного контроля ниже 0,02, принимайте ее как 0,02. Если выше 0,02, смотрите диапазон контроля качества.**

#### Пример:

1. Вычисление Nc:  

№ ячейки	B1	C1	D1
ОП отрицательных контролей	0,02	0,012	0,016
Nc = 0,016 (значение Nc ниже 0,02, поэтому его следует принимать как 0,02)			
2. Вычисление порогового значения (CO) = 0,02 x 0,12 = 0,140

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

Тестовые результаты достоверны, если выполнены критерии контроля качества. Рекомендуется, что каждая лаборатория установила собственную систему контроля качества соответственно анализируемым пациентам.

1. Значение ОП лунки бланка, содержащей только хромогены и стоп раствор меньше 0,080 при 450 нм.
2. Значение ОП положительного контроля должна быть равна или выше 0,800 при 450/630 нм, или при 450 после фонового определения (бланка).
3. Значение ОП отрицательного контроля должна быть ниже 0,100 при 450/630 нм или при 450 нм после фонового определения.

#### 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 антител к вирусу гепатита С. Поэтому, пациенты возможно не инфицированные HCV.

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

**Граничные значения:** Образцы с абсорбцией  $OP \leq$  величины **исключения x2** рассматриваются как граничные и рекомендуется повторное тестирование дубликатов. Повторно положительные образцы рассматриваются как положительные на HCV. Рекомендуется подтверждение диагноза другой аналитической системой (напр. RIBA, WB).

#### ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА И ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

**Клиническая специфичность:** популяция доноров крови из 2948 индивидов была протестирована 3 разными наборами разных производителей. Специфичность ELISA равна 99,55%.

Производители	-	+	Ошибочно полож.	Специфичность
Производитель 1*	2896	38	14	99.52
Производитель 2*	2895	38	15	99.48
анти-HCV ELISA	2897	38	13	99.55

**Клиническая чувствительность:** Среди 480 пациентов с гепатитом С, подтверждено положительность RIBA 3,0, 479 были положительными при тестировании ELISA набором. Чувствительность равна 99,79%.

#### Аналитическая специфичность:

- Нет перекрестной реактивности с образцами пациентов, инфицированных HAV, HIV, HBV, CMV и TP. Не наблюдается влияние ревматоидного фактора до 2000 Е/мл.
- На характеристики этого анализа не влияют повышенная концентрация билирубина, гемоглобина и триолина.
- Замороженные образцы тестировались для проверки влияния сбора и хранения образцов.

#### Работоспособность на ВВИ низких и смешанных титрах анти-HCV панелях:

(См. в оригинале инструкции).

#### Анализ генотипа антител вируса гепатита С:

ГЕНОТИП	ОБРАЗЦЫ	ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЙ
1a-b	15	15
2a-b	13	13
3a-b	10	10
4h	6	6
5	12	12
6	18	18
<b>ОБЩЕЕ</b>	<b>74</b>	<b>74</b>

#### ОГРАНИЧЕНИЯ

- Неповторимые положительные результаты могут появляться через основные биологические характеристики ELISA анализа. Анализ разработан для достижения высоких характеристик чувствительности и специфичности и «непрямая модель» минимизирует неспецифические реакции, что может проявляться через влияние между неизвестными частицами в образце и кроличьими анти-человеческими IgG, что используются как конъюгат. Антитела могут не определяться на ранних стадиях заболевания и в некоторых иммунокомпромиссных индивидов.
- Положительные результаты должны подтверждаться другим доступным методом. Любые положительные результаты должны интерпретироваться с историей пациента и другими клиническими и лабораторными данными.
- Распространенные ошибки: закончился срок годности, плохая процедура промывания, загрязненные реагенты, неправильные шаги процедуры, недостаточная процедура аспирации во время промывания, неточное добавление образцов или реагентов, неполадки оборудования, часов.
- Если после тестирования начальные реактивные образцы, результаты анализа являются отрицательными, эти образцы рассматриваются как не-воспроизводимые (фальшиво положительные) и интерпретируются как отрицательные. Как и для других очень чувствительных ELISA анализов, фальшиво положительные результаты могут возникать по многим причинам, большинство которых связано, но не ограничивается неправильным проведением шага промывания.
- Преобладание маркера влияет на величины анализа.
- Этот набор предназначен только для исследования отдельных образцов сыворотки или плазмы. Не используйте образцы труп, слюны, мочи или других жидкостях.

#### ПОКАЗАТЕЛИ НЕСТАБИЛЬНОСТИ ИЛИ НЕПРИГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

- Значения положительного и отрицательного контролей выходят за границы контроля качества, что указывает на загрязнение реагентов и/или ошибку оператора или оборудования. В таком случае следует повторить анализ. После повторного получения неверных результатов, возьмите новые реагенты.

- Если после смешивания растворов хромогена А и хромогена В в ячейке, цвет смеси превращается на голубой в течении пяти минут, не продолжайте тестирование и замените реагенты.

#### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Компоненты набора стабильны до окончания срока годности, указанной на этикетке при хранении при 2-8<sup>0</sup>С, **не замораживать**. Избегайте загрязнения набора микроорганизмами и химикалиями во время хранения.

#### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ И БЕЗОПАСНОСТЬ

Для диагностики **IN VITRO**.

#### **ТОЛЬКО ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИАЛИСТАМИ**

ELISA анализ является чувствительным к температуре и времени. Для точных результатов строго следуйте инструкции.

- Не меняйте реагенты разных лотов и разных наборов. Компоненты набора точно соответствуют для оптимального исполнения анализа.
- Убедитесь, что все реагенты соответствуют своему лоту. Не используйте реагенты после истечения срока годности.
- Приведите реагенты к комнатной температуре (18-25<sup>0</sup>С) перед использованием. Встряхните реагенты перед использованием. После использования поместите реагенты при 2-8<sup>0</sup>С.
- Используйте только необходимый объем, как указано в шагах процедуры. Иначе это может вызвать низкую чувствительность анализа.
- Не дотрагивайтесь ко дну и к поверхности лунок; отпечатки пальцев и царапины могут влиять на точность считывания. При считывании убедитесь, что лунки сухие и нет пузырей.
- Не допускайте высыхания лунок после промывания, немедленно проводите следующий шаг, не допускайте формирования пузырей при добавлении пузырей.
- Избегайте длительных перерывов между шагами процедуры, соблюдайте одинаковые условия для всех лунок.
- Калибруйте пипетки часто, для подтверждения точности. Используйте одноразовые наконечники для всех образцов и реагентов для предотвращения перекрестного загрязнения. Не пипетируйте ртом.
- Рекомендуется использование автоматических пипеток и сменных наконечников.
- Убедитесь, что температура внутри инкубатора равна 37<sup>0</sup>С.
- При добавлении образца, не дотрагивайтесь ко дну лунок.
- При измерении планшетным считывателем, рекомендуется измерение при 450 и 630 нм.
- Все образцы из человеческой крови являются потенциально инфицированы.
- Материалы человеческого происхождения могут использоваться в этом наборе. Однако, строго следуйте правилам безопасной работы с ними. Не ешьте, не пейте, не курите и не применяйте косметику при проведении анализа.
- Сыворотка быка может использоваться в DAI HCV набора. Альбумин бычьей сыворотки (BSA) и сыворотка фетального теленка (FCS) взята из животных BSE/TSE свободных географических территорий.
- Наконечники пипеток, флаконы, стрипы и контейнеры образцов необходимо собрать и автоклавировать 1 час при 121<sup>0</sup>С или обработать 10% гипохлоридом натрия 30 минут.
- Стоп раствор является сильной кислотой. ЯДОВИТЫЙ. Используйте осторожно. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте водой. ПроКлин 300, что используется в качестве консерванта, может вызывать раздражении кожи.
- На энзимную активность HRP-конъюгата могут влиять пыль и реактивные химикалии и вещества, как гипохлорид натрия, кислоты, щелочи и т.п. Не проводите анализ при присутствии этих веществ.
- Лист безопасности материалов доступен по требованию.
- Если используется автоматическая система, во время инкубации не накрывайте планшет. Вытряхивание остатков из планшета также можно пропустить.

#### ЛИТЕРАТУРА

(См. в оригинале инструкции).

#### **ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА**

ООО «ДИАМЕБ»

Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122

Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: info@diameb.ua

www.diameb.ua