



Набір для визначення Антитіл класу IgM до Вірусу Гепатиту С

HCV IgM EIA kit

Кат. № : 137-2000CM
Количество тестов : 96
Производитель : Equipar (Italy)

Методика перевірена 08/05

Увага: основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції на англ. мові.

ВСТУП

Вірус гепатиту С чи HCV належить до родини флавівірусів і є РНК-вірусом.

Геном кодує структурні компоненти, у процес реплікації і процесінгу протеїнів включені нуклеокапсидний протеїн і два глікопротеїди, а також функціональні включення. Нуклеокапсид кодує частину здається найбільш сталою ізолюваною частинкою у всьому світі.

HCV відповідає за 95% гепатитних інфекцій у реципієнтів через трансфузію крові і за 50% спорадичних NANB гепатитів. HCV звичайно є джерелом асимптоматичних і хронічно перебігаючих гепатитів у значній кількості випадків, інколи призводячи до важких форм захворювання, таких як гепатокарцинома.

Антитіла класу спрямовані на більшість імунодомінантних детермінант вірусних протеїнів і можуть бути визначені у пацієнтів, інфікованих HCV, на початку інфекції.

Визначення антитіл до HCV стало обов'язковою процедурою для контролю зразків крові, щоб уникнути виникнення пост-трансфузійних гепатитів. Вона також є звичною для спостереження за пацієнтами групи високого ризику і хворих, що лікуються інтерфероном.

ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшетки покриті HCV-специфічними імунодомінантними синтетичними антигенами.

Солідна (тверда) фаза спочатку обробляється розведеним зразком і HCV IgM, при наявності, заохплюються антигенами.

Після відмивання всіх інших компонентів зразку протягом другої інкубації, зв'язані HCV IgM визначаються додаванням антитіл проти людських IgM, маркованих пероксидазою (HRP). Фермент, зв'язаний на солідній фазі, реагує з сумішшю субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості анти-HCV IgM антитіл в зразку. Інтерференція з IgG і RF у взірцях є блокована прямо в лунках нейтралізуючим реагентом.

УМОВИ ТЕСТУ

1. Всі реагенти, вміщені в наборі, призначені тільки для діагностичного використання "in vitro".
2. Не використовуйте прострочені реагенти. Не змішуйте реагенти різних наборів.
3. Тест повинен проводитись уважно, щоб отримати достовірні результати.
4. Приведіть всі реагенти до кімнатної температури щонайменше протягом 60 хв перед початком тесту.
5. Уникайте будь-якого забруднення зразків при відкриванні флаконів. Ми рекомендуємо використовувати автоматичні піпетки зі змінними наконечниками. При використанні реагентів не торкайтеся лунок наконечниками.
6. Під час промивання використовуйте тільки мийчий розчин, що є у наборі і уважно слідкуйте поданим інструкціям по промиванню.
7. Слідкуйте, щоб суміш субстрат/хромоген не контактувала з окислюючими агентами чи металічними поверхнями; уникайте сильного світла під час інкубації чи приготування реагентів. При приготуванні суміші субстрат/хромоген використовуйте тільки пластикові, змінні, чисті чи стерильні контейнери.
8. Зразки і матеріали потенційно інфекційні, тому повинні використовуватись з відповідною обережністю. Найкращим для інактивації є аутоклавування при 121°C протягом 30 хв чи обробка гіпохлоритом натрію в концентрації 2,5% протягом 24 год. Цей останній метод може використовуватись з рідкими відходами після їх нейтралізації NaOH.
9. Уникайте контакту рідин зі шкірою і слизовими. Завжди використовуйте захисні рукавички, окуляри і халати, відповідно з правилами.

ВМІСТ НАБОРУ

1. **Стрічкова мікропланшетка – 1:**
12x8 лунок, вкритих синтетичними HCV антигенами. Планшетка міститься в запечатаній упаковці з десикантом. Приведіть планшетку до кімнатної температури перед використанням, щоб уникнути формування вологи всередині упаковки.
2. **Ферментний кон'югат - 1 флакон 0,8 мл:**
Протеїновий буферний розчин, в якому міститься специфічні IgM антитіла, марковані HRP, 20 х концентрації. Він містить протеїнові стабілізатори, 0,2 мг/мл гентаміцину сульфат і 0,1% Катон GC.
3. **Кон'югатний розчинник: - 1 флакон 16 мл:**
Протеїновий буферний розчин для розчинення концентрованого кон'югату. Він містить протеїнові стабілізатори, 0,2 мг/мл гентаміцину сульфат і 0,1% Катон GC в якості консерванту.
4. **Мийчий розчин - 1 флакон 50 мл:**
25х концентрований розчин для розчинення ELISA-ступеневою водою до 1250 мл. Він містить фосфатний буфер, Tween 20 і Катон GC як консерванти. Розведений розчин при зберіганні при кімнатній температурі стабільний протягом 1 тижня.

5. **Хромоген - 1 флакон 8 мл:**
Розчин містить тетраметилбензидин (ТМБ) з активаторами і стабілізаторами, розчинений фосфат/цитратним буфером. Увага: зберігайте захищеним від світла.
6. **Субстрат - 1 флакон 8 мл:**
Містить стабілізований пероксид водню у фосфат/цитратному буфері.
7. **Стоп-розчин - 1 флакон 12 мл:**
8. **Негативний контроль - 1 флакон 1,5 мл:**
Людська сироватка, не реактивна з анти-HCV антитілами. Він містить 0,2 мг/мл гентаміцину сульфату і 0,1% Катон GC в якості консерванту.
9. **Позитивний контроль - 1 флакон 1,5 мл:**
Людська сироватка, високо реактивна з HCV IgM. Він містить 0,2 мг/мл гентаміцину сульфату і 0,1% Катон GC в якості консерванту.
10. **Розчинник зразків - 1 флакон 50 мл:**
Протеїновий розчин для приготування зразків. Він містить детергент, протеїнові стабілізатори, 0,09% азиду натрію і 0,1% Катон GC в якості консерванту.
11. **Нейтралізуючий реагент – 1 флакон 8 мл:**
Протеїновий розчин для нейтралізації IgG і RF у взірцях. Він містить детергент, протеїнові стабілізатори, 0,09% азиду натрію і 0,1% Катон GC в якості консерванту.
12. **Запечатуючі стрічки – 2:**
Пластикові, для накривання планшеток під час інкубації при +37°C.

Примітка: всі матеріали, отримані з людської сироватки, були протестовані на відсутність HBsAg і HIV за допомогою наборів, схвалених FDA. Позитивний і Cut-off контролі були інактивовані від HCV. В будь-якому випадку з цими компонентами необхідно поводитись як з потенційно інфекційними.

ЗБЕРІГАННЯ І СТАБІЛЬНІСТЬ.

1. Набір повинен зберігатися при температурі 2-8°C і бути використаним до дати виходу терміну придатності, вказаному на зовнішній поверхні коробки.
2. Невикористані стрічки повинні бути покладені назад в упаковку з десикантом і міцно запечатані перед зберіганням. Після того, як ящик був вперше відкритий, стрічки стабільні до тих пір, поки десикант не набуде рожевого кольору.
3. Розчинений миючий розчин стабільний при кімнатній температурі протягом 1 тижня, чи 3 тижні при температурі 2-8°C.
4. Суміш хромоген/субстрат стабільна 4 год при кімнатній температурі при уникненні світла.
5. Розчинений кон'югат стабільний 1 тиждень при 2-8°C у стерильному контейнері.
6. Всі інші рідкі реагенти стабільні при 2-8°C при уникненні забруднення.

МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ.

1. Мікропіпетки 10, 100 і 1000 мкл.
2. Вортекс і абсорбуючий папір.
3. ELISA-ступенева вода для розчинення.
4. Таймер.
5. Фотометр ELISA і фільтри 450 нм і 620-630 нм.
6. Інкубатор +37°C.
7. Автоматичний миючий пристрій чи ручний апарат на 300 мкл.

ЗРАЗКИ

Для тесту можуть використовуватись свіжа сироватка чи плазма.

Якщо не використані відразу, зразки можуть зберігатися при 2-8°C протягом 1 тижня. При тривалішому зберіганні потрібно зразки заморожувати до -30°C.

Зразки повинні бути чисті і не забруднені мікроорганізмами. Не піддавайте зразки повторним заморожуванням і відтаюванням, оскільки антитіла можуть бути при цьому пошкоджені. При необхідності видаліть забруднюючі частинки центрифугуванням 2000 обертів протягом 20 хв при кімнатній температурі чи фільтрацією на фільтрах 0,22 мк.

Високо ліпемічні, іктеричні чи гемолізовані зразки не повинні використовуватись, оскільки результати можуть бути хибними.

ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

A – Миючий розчин: концентрований розчин повинен бути розчинений 25x у воді ELISA ступеня перед використанням.

B – Кон'югат: розчиніть концентрований кон'югат 1:20 його розчинником. Легко змішайте на вортексі. Приготуйте тільки необхідний об'єм для тесту.

C – Хромоген/Субстрат: за 5 хв до використання приготуйте цей розчин в змінному пластиковому контейнері, відповідно до потреб, змішуючи 1 об'єм Хромогену з 1 об'ємом Субстрату. Приготуйте тільки необхідний об'єм для тесту.

ІНСТРУКЦІЯ ПО ПРОМИВАННЮ

Для отримання коректних результатів важливим є якісне проведення промивання. Ми, таким чином, рекомендуємо використовувати доброї якості миючий пристрій ELISA.

В загальному 4-5 автоматичних миючих циклів (300 мкл/лунку) достатньо для уникнення некоректних результатів. В будь-якому випадку, ми рекомендуємо відкалібрувати миючу систему на самому наборі, щоб відповідати прийнятним правилам. При ручному митті, ми пропонуємо проводити 5 циклів, використовуючи 300 мкл/лунку і аспірувати рідину 5 разів. В будь-якому випадку, рідина, аспірована зі стрічок повинна бути оброблена гіпохлоритом натрію в концентрації 2,5% протягом 24 годин.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ

Важливі примітки.

1. Щонайменше за 1 годину до використання приведіть всі реагенти до кімнатної температури і змішайте обережно на вортексі
2. Не змішуйте реагенти з різних наборів.
3. Ми рекомендуємо проводити тести в дуплікаті. Проведення тесту на різних етапах повинно виконуватись в тих самих часових інтервалах для всіх лунок. Уникайте тривалих пауз між різними етапами тесту.
4. Пропонується видаляти надлишок миючого розчину з лунок промокальним папером.
5. Утворений під час останньої інкубації колір стабільний протягом 1 год в темноті. Ми рекомендуємо зчитувати результати при 450

нм (зчитувальний фільтр) і показники контролю при 620-630 нм (контрольний фільтр). Використовуйте лунку А1 для проведення процедур з контролем.

тестів HCV IgM, будь-який ELISA-позитивний зразок повинен бути підтверджений іншим альтернативним методом.

Хід тесту:

- Залиште лунку А1 пустою для процедур з контролем. Розведіть зразки 1:51 розчинником зразків (10 мкл зразка + 500 мкл розчинника). Не розводьте контролю, оскільки вони попередньо вже розведені і готові до використання. Внесіть 50 мкл нейтралізуючого реагенту в усі лунки: не вносьте в лунку А1 і в лунки для контролів. Потім додайте контролю і зразки у лунки у відповідності до таблиці:

Позиція	Калібратор/зразок
A1	Лунка для контролю
B1+C1	100 мкл Негативного Контролю
D1	100 мкл Позитивного Контролю
E1...H12	50 мкл Зразків

Запечатуйте планшкетку і інкубуйте стрічки з лунками 60 хв при +37°C.

- Розпечатайте планшкетку і промийте її згідно інструкції. В той час приготуйте ферментний кон'югат, розвівши його 1:20 розчинником як описано вище.
- Додайте 100 мкл розчиненого кон'югату у всі лунки, крім А1, інкубуйте запечатану планшкетку 60 хв при +37°C.
- Розпечатайте планшкетку і промийте її згідно інструкції. В той час приготуйте суміш хромоген/субстрат як описано вище.
- Додайте 100 мкл суміші хромоген/субстрат у всі лунки, включаючи А1. Інкубуйте при кімнатній температурі 20 хв в захищеному від сонця місці.
- Зупиніть реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину у всі лунки, включаючи А1.
- Зчитайте результати планшкетки при 450 нм і при 620-630 – А1.

ВАЛІДНІСТЬ ТЕСТУ

Тест вважається валідним, якщо:

- Оптична густина (ОГ) 450 нм лунки А1 становить < 0,100.
- Після А1 середнє значення ОГ 450 нм негативного контролю (НК) < 0,200.
- Середнє значення ОГ 450 нм позитивного контролю (ПК) > 0,500.

У випадку, якщо вказані величини не відповідають правильним показникам, перед повторенням тесту перевірте дату придатності набору, реагентів і правильність процедури з контролями і зразками.

ВИРАХУВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Якщо валідність тесту підтверджена, вирахуйте величину виключення (cut-off) за наступною формулою:

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0,250$$

Зразки зі значенням ОГ 450 нм нижчим, ніж ВВ, класифікуються як негативні по HCV IgM.

Зразки зі значеннями ОГ 450 нм вищими, ніж ВВ, класифікуються як позитивні по HCV IgM.

Оскільки деяка несправжня позитивність (2-7% в залежності від популяції) була подана в літературі для

Приклад вирахування.

Середнє ОГ 450 нм НК	0,050 НК	
ПК 450 нм	1,200	
ВВ = НК + 0,250	= 0,300	
Зразок 1	ОГ 450 нм = 0,080	Негативний
Зразок 2	ОГ 450 нм = 1,158	Позитивний

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТУ

ЧУТЛИВІСТЬ: чутливість тесту була визначена на основі позитивних зразків при порівнянні з схваленим FDA набором для ринку. Чутливість становить > 98%.

СПЕЦИФІЧНІСТЬ: була вирахована за позитивними і негативними зразками, попередньо віднесених до тієї чи іншої групи за допомогою схваленого FDA набором для ринку. Специфічність становить > 98% на сироватці та плазмі.

ВІДТВОРЮВАНІСТЬ: визначена за позитивними і негативними контролями, протестованих у реплікантів різними шляхами. В залежності від їхнього значення ОГ 450 нм була отримана CV в межах 4-12%.

Інформація для замовлення:

ПМП «ДІАМЕБ»
 вул. Чорновола, 97, м. Івано-Франківськ, 76005
 Тел.: (0342) 775 122
 Факс: (0342) 775612
 E-mail: info@diameb.com
www.diameb.com