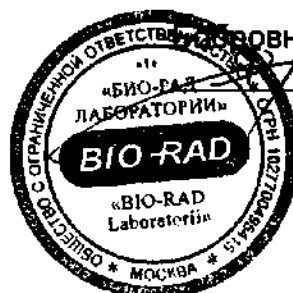


«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»



Генеральный директор Е.В.

«09» *сентября* 2010 г.

**Инструкция по применению изделия медицинского
назначения**

**«Тест-система диагностическая
«Десискан ВГС ПЛЮС» (Deciscan HCV PLUS) для
идентификации антител против антигенных
детерминант вируса гепатита С методом иммуноблота в
сыворотке и плазме крови человека»**

2010

СОДЕРЖАНИЕ

- 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**
- 2. ПРИНЦИП ТЕСТА**
- 3. СОСТАВ НАБОРА**
- 4. МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ**
- 5. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ**
- 6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**
- 7. ОБРАЗЦЫ**
- 8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ**
- 9. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА**
- 10. СЧИТЫВАНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ**
- 11. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА**
- 12. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА**
- 13. ЛИТЕРАТУРА**

1 - КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

ДЕСИСКАН® ВГС ПЛЮС - иммуноферментный тест на полосках для иммуноблотинга, предназначенный для идентификации антител к вирусу гепатита С в сыворотке крови человека. Точная характеристика этих антител необходима для лучшего понимания серологии вируса гепатита С (HCV).

2 - ПРИНЦИП ТЕСТА

В наборе ДЕСИСКАН® ВГС ПЛЮС в качестве твердой фазы используется мембрана, закрепленная на пластиковом стрипе (полоске). На мембране в нижеуказанной последовательности нанесены:

1) Античеловеческий Ig G контроль

Данный контроль обеспечивает:

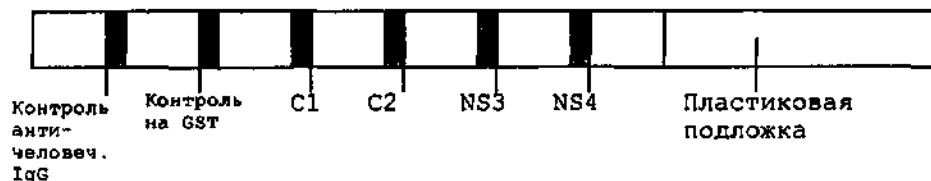
- контроль внесения образца;
- контроль реагентов (конъюгата и субстрата);
- считывание результатов, с учетом интенсивности контрольного сигнала.

2) Контроль на GST

В процессе синтеза рекомбинантных белков, гены кодирующие белки NS3 и NS4 встраивают в ген, кодирующий Глутатион трансферазу S (GST). Контроль на GST выявляет присутствие анти - GST антител в образце, которые могут привести к ложноположительной реакции.

3) Антигены HCV

- Рекомбинантные белки, полученные из отобранных клонов *E.coli* - белки неструктурной области: NS3 и NS4.
- Белки, которые были выбраны из-за высокой иммуногенности:
 - в структурной области - C1 и C2
 - в неструктурной области - NS4



Процедура анализа включает следующие шаги:

- 1) Тестируемая сыворотка инкубируется со стриповой полоской. Если в сыворотке присутствуют антитела к HCV, происходит их связывание на твердой фазе.
- 2) После отмывки добавляются античеловеческие IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой (конъюгат). Конъюгат взаимодействует с антителами, связавшимися с твердой фазой на предыдущем этапе.
- 3) Несвязавшийся конъюгат отмывается; комплекс антиген/антитело выявляется добавлением субстрата.
- 4) После остановки реакции, производится считывание окрашенных полос и интерпретация результатов.

3 - СОСТАВ НАБОРА

Метка	Реагент	Количество
R1	Стриповая полоска с нанесенными рекомбинантными белками и синтетическими пептидами из области капсида, NS3 и NS4.	24 стрипа
R2	Промывающий раствор концентрированный (5x)	100 мл
R3	Отрицательная контрольная сыворотка Человеческая сыворотка, не содержащая анти-HCV антител, отрицательная по HBsAg и анти-HIV1, 2 антителам. Консервант: 0.1% азид натрия	0.2 мл

R4	Положительная контрольная сыворотка Человеческая сыворотка, положительная по анти- HCV антителам, отрицательная по HBsAg и анти- HIV1, 2 антителам и инактивированная нагреванием. Консервант: 0.1% азид натрия	0.2 мл
R5	Раствор для разведения образцов сыворотки Tris NaCl буфер с молоком с добавлением фенолового красного. Консервант: 0.25% Kathon	90мл
R6	Конъюгат Tris NaCl буфер с зеленым красителем. Анти- человеческие (козы) IgG антитела, меченые щелочной фосфатазой. Консервант: 0.1% азид натрия	90мл
R8	Субстрат БХИФ/НСТ 5-Бromo-4-хлоро-индолил-фосфат (БХИФ) и Нитросиний тетразолий (НСТ)	90 мл
R9	Стоп-реагент 50мМ лимонная кислота Консервант: 0.01% Мертиолят	90 мл
Разное	Ванночки на 6 образцов	4

4 - МАТЕРИАЛЫ НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ С НАБОРОМ

Дистиллированная или деионизованная вода.
 Гипохлорит натрия и бикарбонат натрия.
 Фильтровальная бумага.
 Защитные очки.
 Одноразовые перчатки.
 Автоматические или полуавтоматические пипетки объемом на 10 мкл.
 Градуированные пипетки на 3 мл.
 Мерные цилиндры на 100, 250 и 500 мл.
 Шейкер, встряхивающий в двухмерном или трехмерном пространстве.
 Контейнер для контаминированных остатков.
 Вакуумный насос с безопасной вилкой.
 Шейкер-инкубатор-распределитель типа LS12 или полный автомат для проведения блотов (*).

(*) Обращайтесь в местное представительство компании за информацией о рекомендуемом оборудовании.

5 - ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

все реагенты набора предназначены для диагностических целей в системе in vitro,
 все процедуры методики выполняйте в одноразовых перчатках;
 никогда не пипетируйте ртом;
 ни один метод детекции не может гарантировать отсутствие или присутствие патогенных агентов (HIV, HCV, HBV и т.д.) в исследуемых образцах и реагентах человеческого происхождения. Следует рассматривать их как потенциально контаминированные и работать с соответствующими мерами предосторожности, считайте все оборудование, контактирующее с образцами, реагенты человеческого происхождения и промывающий раствор контаминированными; избегайте разбрызгивания образцов или растворов, содержащих образцы.
 В случае разбрызгивания растворов, не содержащих кислоты, обработайте поверхность 10% раствором гипохлорида натрия, а затем фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для контаминированных остатков.

В случае разбрызгивания кислотосодержащих растворов нейтрализуйте их бикарбонатом натрия и обработайте раствором гипохлорида натрия и фильтровальной бумагой, которую необходимо выбросить в контейнер для загрязнированных остатков.

Образцы и реагенты человеческого происхождения, как и загрязненные материалы следует выбрасывать после дезактивации:

- замачиванием в растворе гипохлорида натрия в конечной концентрации не менее 5% в течение 30 минут.
- или автоклавированием при 121 °C в течение 2 часов.

ВНИМАНИЕ!

никогда не помещайте раствор гипохлорида натрия в автоклав;

не забывайте нейтрализовать и/или автоклавировать промывные остатки или любые жидкости, содержащие биологические образцы, до слива их в раковину.

Некоторые реагенты содержат азид натрия. Этот компонент может реагировать со свинцом и медью, образуя взрывоопасные соединения. Во избежание накопления азидов в трубах, когда реагенты выливаются в раковину, нейтрализуйте их и смойте большим количеством воды.

6 - МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для получения достоверных результатов необходимо следовать правилам хорошей лаборатории:

не смешивайте и не используйте в одном и том же тесте реагенты из разных серий;

не используйте реагенты по истечении срока их годности;

дайте постоять реагентам при комнатной температуре в течение 30 минут перед началом использования;

тщательно разводите и перемешивайте реагенты, избегая контаминации;

не проводите тесты в присутствии активных испаряющихся веществ (кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут повлиять на ферментативную активность конъюгата.

используйте хорошо промытую посуду, ополоснутую дистиллированной водой, предпочтительней использовать одноразовую посуду;

строго соблюдайте режим промывания и следите, чтобы промывающий раствор полностью заполнял все лунки и затем был полностью удален;

используйте новые наконечники для каждой сыворотки;

никогда не используйте одну и ту же посуду и наконечники для разных реагентов.

7 - ОБРАЗЦЫ

В тесте используют неразведенную сыворотку или плазму. При использовании сыворотки, отцентрифугируйте ее как можно быстрее во избежание гемолиза. Гемолиз может повлиять на результаты теста. Образцы, содержащие агрегаты должны быть отцентрифугированы перед выполнением теста, поскольку могут давать ложно-положительные результаты. Образцы следует хранить при +2-8 °C, если тестирование выполняется в течение 24 часов после взятия материала, или хранить при -20 °C в течение нескольких месяцев. Избегайте повторного размораживания-замораживания. Если образцы необходимо транспортировать, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки этиологических агентов.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ЗАГРЯЗНЕННЫЕ, ГИПЕРЛИПЕМИЧЕСКИЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ.

8 - ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ, СРОК ГОДНОСТИ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Промывающий раствор - 5-ти кратный концентрат

Разведите промывающий раствор 1:5 и тщательно перемешайте. На один стрип необходимо 20 мл готового к использованию раствора.

Разведенный промывающий раствор стабилен в течение месяца при температуре хранения +2-8 °C.

Все остальные реагенты при хранении при +2-8 °C стабильны до конца срока годности, указанного на упаковке.

Перед использованием тщательно перемешайте раствор для разведения образцов, конъюгат и проявляющий раствор, переворачивая флаконы несколько раз вверх и вниз.

9 - МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- Строго следуйте инструкции.
- Положительный и отрицательный контроли должны использоваться при каждой постановке анализа и при использовании наборов из другой партии (см. номер партии).
- Следуйте правилам хорошей лабораторной практики.
- Подпишите стрипы в соответствии с номерами сывороток пациентов, отметьте стрипы для положительного и отрицательного контроля.
- Приготовьте промывающий раствор (раздел 8).
- Достаньте из картриджа необходимое количество стрипов. Брать стрипы нужно за пластиковую рамку, не дотрагиваясь до мембраны. Поместите стрипы в отделения ванночки мембраной вверх (одному стрипу соответствует одно отделение ванночки).

ПРОТОКОЛ

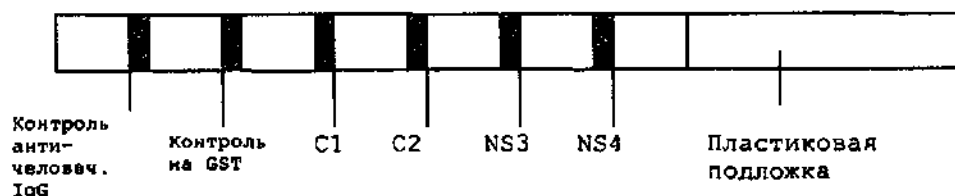
1. В каждое отделение внесите 3 мл раствора для разведения образцов. Чтобы стрип смочился, инкубируйте, покачивая, 5 минут при комнатной температуре.
2. Добавьте 10 мкл образца или контрольных сывороток в соответствующие отделения ванночки, промойте наконечник пипетки 3 раза раствором, находящимся в ванночке.
3. Инкубируйте, покачивая, в течение 2 часов при комнатной температуре.
4. При помощи вакуумного насоса с емкостью для сброса, в которой находится гипохлорит натрия, удалите содержимое каждого отделения ванночки. Хорошо промойте носик насоса между аспирацией содержимого разных отделений ванночки. Добавьте по 3 мл промывающего раствора в каждое отделение, инкубируйте покачивая в течение 2-х минут.
5. Повторите шаг 4 дважды, чтобы всего получилось 3 процедуры отмывки; затем удалите последнюю порцию промывающего раствора.
6. В каждое отделение ванночки добавьте по 3 мл конъюгата. Инкубируйте, покачивая, в течение 30 мин при комнатной температуре.
7. Аспирируйте жидкость из каждого отделения. Отмойте стрипы 3 раза, как указано в пункте 4 и удалите последнюю порцию промывающего раствора.
8. В каждое отделение добавьте по 3 мл субстрата. Инкубируйте, покачивая, 6 мин при комнатной температуре.
9. Аспирируйте жидкость из каждого отделения.
10. В каждое отделение добавьте по 3 мл стоп-реагента. Инкубируйте, покачивая 5 мин при комнатной температуре.
11. Аспирируйте жидкость из каждого отделения и промойте стрипы 3 раза дистиллированной водой.
12. Достаньте стрипы из отделений и хорошо просушите между 2 листами фильтровальной бумаги. Храните стрипы в темном месте, чтобы избежать появления фоновых пятен.

10 - СЧИТЫВАНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

1) СЧИТЫВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На всех стрипах расположение и идентификация контрольных полос и полос HCV антигенов соответствует указанной ниже схеме. Расположение антигенов на стрипе подтверждается положительной контрольной сывороткой.

Контроль на античеловеческие IgG располагается с противоположного от пластиковой подложки конца, далее нанесены соответственно GST - C1- C2 - NS3 - NS4.



Перед считыванием результатов стриповая полоска должна быть высушена. Стрип считается сухим, если общий фон - белый.

Считывание

Интенсивность сигнала каждой полосы антигена определяется для каждого стрипа отдельно по сравнению с интенсивностью сигнала на полосе контроля античеловеческого IgG.

Интенсивность полосы

	Оценка
Сигнал сильнее, чем на анти-IgG контроле	3+
Сигнал, равный сигналу на анти-IgG контроле	2+
Сигнал слабее, чем на анти-IgG контроле	1+
Слабый сигнал: полоса выявляется очень слабо	0.5+
Сигнал отсутствует	0

Достоверность анализа

Контрольная полоса должна быть четко видна невооруженным глазом. Это свидетельствует о том, что в процессе анализа был нанесен образец сыворотки, добавлен конъюгат и проявляющий раствор.

Если контрольная полоса не соответствует этим требованиям, интерпретацию результатов проводить нельзя.

Отрицательная контрольная сыворотка: Видна только анти-IgG контрольная полоса, никакие другие полосы не выявляются.

Положительная контрольная сыворотка: Четко видны анти IgG - контрольная полоса и 4 полосы с антигенами HCV. Полоса с GST не должна давать никакого сигнала.

2) ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

РЕЗУЛЬТАТ	ОТВЕТ
- Ни одна из 4 полос с антигенами HCV не видна	ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ
- Видна 1 полоса с антигеном HCV или видны 2 полосы, только капсидные (C1 и C2)	НЕОПРЕДЕЛЕННЫЙ *
- Интенсивность 2 полос из различных генных участков равна 0.5+	ВОЗМОЖНО ПОЗИТИВНЫЙ *
- Интенсивность по крайней мере 2 полос из различных генных участков больше 0.5+	ПОЗИТИВНЫЙ

ПРИМЕЧАНИЕ: В случае, если выявляется полоса с GST, интерпретацию результатов можно проводить только по полосам C1и C2 антигенов HCV (синтетические пептиды).

*) Согласно современным представлениям о серологии HCV, через некоторое время необходимо провести повторный анализ с другим образцом сыворотки.

Примеры интерпретации результатов

	C1	C2	NS3	NS4	ИНТЕРПРЕТАЦИЯ
A	1+	2+	0	0	Неопределенный
B	0	0.5+	0.5+	0	Возможно положительный
C	0	0	0	0	Отрицательный
D	0	2+	1+	0.5+	Положительный
E	0	0	0.5+	0	Неопределенный
F	0	0.5+	1+	0	Возможно положительный

<u>Интенсивность полосы</u>	<u>Оценка</u>
Сигнал сильнее, чем на анти-IgG контроле	3+
Сигнал, равный сигналу на анти-IgG контроле	2+
Сигнал слабее, чем на анти-IgG контроле	1+
Слабый сигнал: полоса выявляется очень слабо	0.5+
Сигнал отсутствует	0

11 - ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Чувствительность

Исследования по чувствительности теста проводились на панели хорошо изученных сывороток. В нее входили 39 сероконверсных образцов от 19 пациентов и 88 образцов от пациентов с хроническим гепатитом С.

Результаты, полученные на наборе DECISCAN HCV PLUS, показали очень хорошее совпадение с ожидаемыми результатами.

Специфичность

Из 201 образца, отрицательных на скрининговых тестах, на которых изучалась специфичность, в 9 обнаруживалась изолированная реактивность, в некоторых из них она также выявлялась и на других коммерческих блот-тестах.

Перекрестная реактивность

Из общего числа сывороток (81), положительных на другие патогенные маркеры, 79 не показали никакой реактивности. 2 имели реактивность, которая также обнаружилась и на другом коммерческом наборе.

Точность

Тестирование внутри одной постановки и повторные постановки в течение некоторого времени показали одни и те же результаты. Проводились также дополнительные параллельные испытания, которые выполняли 3 разных лаборанта, и которые показали идентичные результаты.

12 - ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Тест не является окончательно подтверждающим HCV инфекцию. Это дополнительный тест, который позволяет охарактеризовать антитела, направленные против различных участков вируса.

13 - ЛИТЕРАТУРА

См. французскую версию.