

recomBlot HCV IgG 2.0

Immunoblot-Test mit rekombinant produzierten und gelelektrophoretisch aufgetrennten Antigenen zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das **Hepatitis-C-Virus (HCV)** in humanem Serum oder Plasma.

1. Allgemeines/ Verwendungszweck

Der *recomBlot HCV IgG 2.0* ist ein qualitativer *in-vitro*-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG-Antikörpern gegen das Hepatitis-C-Virus (HCV) in humanem Serum oder Plasma. Im Unterschied zu Enzymimmunoassays oder Spotttests erlaubt der Test durch die elektrophoretische Auftrennung der Antigene eine sichere Identifizierung von spezifischen Antikörpern. Der **recomBlot HCV IgG 2.0** wird zur Bestätigung von im Screening Test positiven Proben verwendet.

2. Das Hepatitis-C-Virus

Das Hepatitis-C-Virus wurde vor seiner Identifizierung den sogenannten NonA-/NonB-Hepatitisviren zugeordnet, die den Großteil der durch Bluttransfusion oder durch Blutprodukte übertragenen Hepatitiden verursachten. Charakteristisch für die NonA-/NonB-Hepatitis ist eine Inkubationszeit von 2 bis 26 Wochen (im Mittel 8 Wochen) und einem meist relativ milden Verlauf in der akuten Phase. Bis zu 80 % der Patienten entwickeln eine chronische Hepatitis, die in manchen Fällen zu einer Leberzirrhose oder einem primären Leberzellkarzinom führen kann. Weltweit schätzt man die Zahl der chronisch infizierten Personen auf 170 Millionen. In Deutschland liegt die Prävalenz bei 0,6 %.

Als infektiöses Agens dieser Hepatitis wurde 1989 ein Einzelstrang-RNA Virus identifiziert, das als Hepatitis-C-Virus (HCV) bezeichnet wurde und zur Familie der Flaviviren gehört, in die auch das Gelbfieber- und das FSME-Virus eingeordnet werden. Das Genom mit einer Länge von 9,5 Kb codiert für ein Kapsidprotein (Core), zwei Membranproteine (E1 und E2) und vier Nichtstrukturproteine (NS2 bis 5).

2.1 Epidemiologie und Übertragung

Vor Einführung geeigneter Testverfahren verursachte das Hepatitis-C-Virus 80 bis 90 % der NonA-/NonB-Hepatitiden. Es kommt nur beim Menschen vor und wurde meist durch Bluttransfusionen oder Blutprodukte übertragen. Eine von drei- bis fünftausend Blutspenden ist positiv. Das Risiko, sich beim Erhalt einer positiven Blutkonserve zu infizieren, liegt bei 75 %.

80 % aller Neuübertragungen treten heute bei Drogenabhängigen, verursacht durch das gemeinsame Benutzen von Spritzen, auf. Weitere Übertragungsmöglichkeiten sind Sexualverkehr sowie Haushaltskontakt mit infizierten Patienten bei mangelhaften hygienischen Verhältnissen. Krankenhauspersonal ist durch Verletzungen mit Kanülen gefährdet. Das Virus kann während der Schwangerschaft von der Mutter auf das Kind übertragen werden. Bei etwa 30 % der Erkrankungsfälle kennt man den Übertragungsweg nicht.

2.2 Pathogenese und Klinik

Das Virus gelangt vorwiegend über kontaminiertes Blut oder Blutprodukte direkt in den Kreislauf, wird durch infizierte Makrophagen zur Leber transportiert, infiziert hier die Hepatozyten und zerstört diese. Die Folge ist eine Leberentzündung mit Zellnekrosen.

Etwa 75 % der Infektionen verlaufen inapparent, schwere Verläufe sind selten. Bei bis zu 80 % aller Infizierten entstehen chronisch-persistierende oder chronisch-reaktivierte Hepatitiden. In 10 bis 20 % der chronischen Fälle entwickelt sich eine Leberzirrhose; bei etwa vier Prozent von diesen ein primäres Leberzellkarzinom.

3. Diagnostik

Der erste Schritt in der Labordiagnostik der Hepatitis-C-Infektion besteht im Nachweis spezifischer Antikörper gegen HCV-Proteine mittels ELISA (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) als Screening-Test. Die Reaktivität im ELISA wird anschließend durch das spezifischere Westernblot-Testverfahren bestätigt. Die höhere Spezifität wird u.a. durch die Auftrennung der HCV-Antigene im Blot und die dadurch isoliert zu bewerteten Antigen-Reaktivitäten erreicht.

Bei einem HCV-Antikörper-positiven Befund ist der virale RNA-Nachweis durch NAT (Nukleinsäure-Amplifikations-Technik) wie z.B. RT/PCR angezeigt, um die Viruspersistenz zu bestätigen oder auszuschließen, da sich aus diesem Befund therapeutische Konsequenzen ergeben könnten. Bei einem

negativen PCR-Befund bei bestätigtem Antikörperbefund sollte die RT/PCR im Abstand von einigen Monaten wiederholt werden. Erst dann ist eine relativ verlässliche Aussage zur Chronizität der HCV-Infektion möglich.

Der Antikörpernachweis gegen HCV-spezifische Antigene gelingt in der Regel drei bis vier Wochen nach einer HCV-Infektion. Die Ausnahme bildet das „diagnostische Fenster“ während der Inkubations- und sehr frühen Akutphase der Infektion, in dem die geringe Viruslast die Antikörperantwort verzögert. Ebenso zeigen immunsupprimierte Patienten und perinatal infizierte Neugeborene (durch mütterliche Antikörper) ein „verzerrtes“ Antikörperbild. Die Diagnose einer HCV-Infektion ist in diesen Fällen nur durch den wiederholten Nachweis des HCV-Genoms mittels NAT gesichert.

4. Testprinzip

Die verwendeten gereinigten, rekombinanten Antigene werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Die HCV-Proteine werden dann elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western-Blotting). Diese Membran wird anschließend zur Blockierung freier Bindungsstellen mit einer Proteinlösung inkubiert, gewaschen und nach Zerschneiden in Streifen in Röhrchen verpackt.

Zum Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern werden die Streifen mit der verdünnten Serum-Probe inkubiert, wobei die Antikörper sich an die Antigene auf den Streifen anlagern. Nicht gebundene Antikörper werden anschließend abgewaschen und die Streifen in einem zweiten Schritt mit anti-human-IgG inkubiert, das mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Mit einer durch die Peroxidase katalysierten Färbereaktion werden spezifisch gebundene Antikörper nachgewiesen. Falls eine Reaktivität gegen eines der HCV-Proteine gefunden wird, erscheint diese als dunkle Bande auf dem Streifen.

Als Reaktions-Kontrolle ist am oberen Ende der Streifen - unter der Nummer - eine Bande mit anti-human-Immunglobulin aufgetragen, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muss.

Für den *recomBlot* HCV IgG 2.0 werden fünf gentechnologisch erzeugte HCV-Antigene verwendet:

NS-3:	Nichtstrukturprotein mit Protease- und Helicase-Aktivität.
Helicase:	Teilbereich des NS-3-Proteins mit Helicase-Aktivität.
NS-5-12:	Teilbereich der RNA-Polymerase (=NS5) des HC-Virus.
NS-4:	mit noch unbekannter Funktion, verwendet wird der N-terminale Bereich von NS-4.
Core:	Kapsid-Antigen – das Strukturprotein des Virus, das die Proteinhülle um das virale Genom bildet.

Um mögliche Kreuzreaktionen und damit falsch-positive Aussagen zu vermindern, wurden diese Antigene ohne einen Fremdanteil produziert.

5. Packungsinhalt

recomBlot HCV IgG 2.0

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHEUF 10 X	100 ml	Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl, KCl, Detergenz, Konservierungsmittel: Methylisothiazolon und Oxypyron
SUBS TMB	45 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
MILKPOW	5 g	Magermilchpulver
INCUTRAY	2 Stück	Inkubations-Schalen mit je 10 Vertiefungen
CONTRSTR	1	Vorentwickelter Kontrollstreifen (kitspezifisch)
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TESTSTR	2 Stück	Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Teststreifen, beschichtet mit rekombinant hergestellten HCV -Antigenen
CONTROL ± IgG	80 µl	Schwachpositiv IgG-Serumkontrolle (Weiß e Verschlusskappe) Humaner Ursprung, anti-HIV-1/2 und HBs-Ag negativ
CONTROL - IgG	80 µl	Negativ IgG-Serumkontrolle (Blaue Verschlusskappe) Humaner Ursprung, anti-HIV-1/2, anti-HCV und HBs-Ag negativ
CONJ IgG	60 µl	Anti-human IgG Konjugat (tausendfach konzentriert, Grüne Verschlusskappe) Aus Kaninchen, enthält NaN ₃ .

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser, Absaugsystem mit Desinfektionsfalle, Mikropipetten, Plastikpinzette, Schüttler, Messzylinder, Laborwaage.

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1 Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Für die Herstellung der Kontrollseren wird Blut von Spendern verwendet, bei denen keine Antikörper gegen HIV 1/2 und kein Hepatitis Bs-Antigen nachgewiesen wurden. Da trotzdem eine Infektion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss das Produkt mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie die Patientenproben.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate enthalten Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.
- ☞ Inkubationsschalen nur einmal verwenden.
- ☞ Streifen vorsichtig mit einer Plastikpinzette handhaben.

7.2 Hinweise zur Handhabung

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern, **nicht einfrieren**. Vor Testbeginn sind alle Bestandteile für mindestens 30 Minuten auf 18°C - 25°C (Raumtemperatur) zu temperieren. Die Testdurchführung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

Vor Gebrauch die Kontrollseren sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen. Die Patientenseren ebenfalls gut mischen.

Das Röhrchen mit den Teststreifen ist erst unmittelbar vor Gebrauch zu öffnen, um eine Kondenswasserbildung zu vermeiden. Die nicht benötigten Streifen verbleiben im Röhrchen und werden weiterhin bei 2°C - 8°C gelagert (Röhrchen wieder gut verschließen, Teststreifen dürfen vor Versuchsbeginn nicht feucht werden!).

Die Schwachpositiv Kontrolle sowie die Negativ Kontrolle müssen bei jedem Versuchsdurchgang unabhängig von der Anzahl der zu testenden Seren mitgeführt werden. Nur so ist die korrekte Testinterpretation möglich.

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Es dürfen nur Einzelreagenzien verwendet werden, deren Chargennummer mit der entsprechenden Chargennummer auf dem Etikett der Kitverpackung übereinstimmt.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3 Herstellung der Lösungen

7.3.1 Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Dieser Puffer wird für die Serum- und Konjugatverdünnung sowie die Waschschrte benötigt.

Vor dem Verdünnen ist das Volumen des Waschpuffers für die entsprechende Anzahl der durchzuführenden Tests zu bestimmen.

Das Magermilchpulver wird zuerst in Waschpuffer-Konzentrat vorgelöst und diese Mischung dann mit deionisiertem Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt (Verdünnung: 1 + 9). Die benötigten Mengen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Tabelle 1: Waschpuffer pro eingesetzte Teststreifen

eingesetzte Teststreifen	Magermilch Pulver	Waschpuffer-Konzentrat	Deionisiertes Wasser	gebrauchsfertiger Waschpuffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

7.3.2 Herstellung der Konjugatlösung

Die Konjugatlösung für die IgG-Bestimmung ist unmittelbar vor Gebrauch herzustellen, eine Lagerung der gebrauchsfertigen Konjugatlösung ist nicht möglich.

Ein Teil des IgG-Konjugat-Konzentrats wird mit 1000 Teilen gebrauchsfertigem Waschpuffer verdünnt (1 + 1000).

Die benötigten Mengen sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Volumina für in der Tabelle nicht aufgeführte Streifen-Anzahlen sind rechnerisch zu ermitteln.

Tabelle 2: Volumina der Anti-human-IgG-Konjugat-Verdünnung

eingesetzte Teststreifen *	IgG-Konjugat-Konzentrat	gebrauchsfertiger Waschpuffer
1	2 µl	2 ml
2	4 µl	4 ml
3	6 µl	6 ml
5	10 µl	10 ml
10	20 µl	20 ml
15	30 µl	30 ml
20	40 µl	40 ml

* Die Mengen sind ohne Totvolumen berechnet. Je nach Abarbeitung (manuell bzw. an einem Gerät) bitte zusätzliche Konjugatlösung für 1 bis 3 Streifen ansetzen.

7.3.3 Substratlösung

Das Substrat ist gebrauchsfertig. Vor Beginn der Färbung auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) bringen.

Eine Kontamination der nicht verwendeten Substratlösung durch unsterile Pipettenspitzen etc. muss unbedingt vermieden werden, da dadurch die Sensitivität des Testes beeinträchtigt werden kann.

7.4 Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern.

Gebrauchsfertiger Waschpuffer kann bei 2°C - 8°C vier Wochen gelagert werden.

Die Konjugatlösung muss immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde, um eine Hämolyse zu vermeiden. Hitzeinaktivierte Proben können zu erhöhten Hintergrundreaktionen führen. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation aus der Probe zu entfernen.

Die Austestung von lipämischen, hämolytischen oder ikterischen Proben ergaben keine falsch bewerteten Ergebnisse (siehe Kapitel 12), weswegen einer Verwendung dieser Seren nichts entgegensteht. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass diese Proben im recomBlot HCV IgG 2.0 einen dunklen Hintergrund ergeben können.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.

9. Testdurchführung

9.1 Allgemeines

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hängt in starkem Maße vom gleichmäßigen Waschen der Streifen ab. Die unter 9.3 und 9.5 beschriebenen Waschfrequenzen sollten deshalb immer eingehalten werden.

9.2 Inkubation der Proben

1. Für jeden Testansatz wird eine Vertiefung einer Inkubationsschale benötigt (siehe 6). In die Vertiefungen werden je **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers pipettiert. In die mit gebrauchsfertigem Waschpuffer gefüllten Vertiefungen wird anschließend je ein Teststreifen vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette eingetaucht. Die Streifennummerierung zeigt nach oben.

Achtung!

Die Streifen müssen vollständig mit Waschpuffer benetzt und untergetaucht sein.

Verwendete Röhrchennummer und Streifennummer im Auswertebogen notieren.

2. Probenzugabe

IgG-Testdurchführung: 20 µl einer unverdünnten Probe (Humanserum oder Plasma) oder der entsprechenden Schwachpositiv Kontrolle bzw. Negativ Kontrolle werden in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert (**Verdünnung 1 + 100**).

Bitte achten Sie darauf, die Probe an einem Ende des untergetauchten Streifens in den Waschpuffer einzupipettieren und schnellstmöglich durch vorsichtiges Schütteln der Inkubationswanne einzumischen.

Probennummern im Auswertebogen notieren.

Die Inkubationsschale wird mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt und unter leichtem Schütteln **1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Es ist darauf zu achten, dass die Inkubationslösungen nicht in andere Vertiefungen verschleppt werden; insbesondere beim Öffnen und Schließen des Deckels sind Spritzer zu vermeiden (Gefahr der Kreuzkontamination).

9.3 Waschen

1. Nach der Inkubation werden die Kunststoffdeckel vorsichtig von den Inkubationsschalen abgenommen.
2. Die Serumverdünnung wird vorsichtig aus den einzelnen Vertiefungen abgesaugt.

Achtung!

Nach dem Absaugen der Lösungen aus einer Vertiefung sind die Pipettenspitzen zu wechseln oder nach jedem Absaugvorgang gut mit deionisiertem Wasser zu spülen, da die Gefahr einer Kreuzkontamination besteht.

Bei maschineller Abarbeitung sind diesbezüglich die Hinweise des Geräteherstellers zu beachten.

3. In jede Vertiefung werden anschließend **2 ml** des gebrauchsfertigen Waschpuffers gegeben und für **5 Minuten** unter leichtem Schütteln auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Waschvorgang wird der Waschpuffer abgesaugt.
4. Der Waschschrift unter Punkt 3 wird insgesamt **dreimal** durchgeführt.

9.4 Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Nach dem Waschen der Streifen werden in jede Vertiefung **2 ml** der entsprechend vorbereiteten Konjugatlösung (siehe Tabelle 2) gegeben und **45 Minuten** unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die Inkubationsschale mit dem Kunststoffdeckel abgedeckt.

9.5 Waschen

Die Konjugatlösungen werden aus den Inkubationswannen abgesaugt und die Streifen erneut gewaschen (vergleiche 9.3).

9.6 Substratreaktion

In jede Vertiefung werden **1,5 ml Substratlösung** gegeben und **5 – 15 Minuten** unter leichtem Schütteln und unter Beobachtung bei Raumtemperatur inkubiert.

Achtung!

Den Färbungsprozess beobachten, und alle Streifen so lange in der Färbelösung belassen, bis bei den mit der Schwachpositiv Serumkontrolle inkubierten Streifen zumindest das Core-Antigen schwach zu erkennen ist. Alle anderen Antigene können, aber müssen nicht auf dem nassen Streifen zu sehen sein (s. 11.2)!

Bei hochpositiven Seren kann es zu einer Überreaktion der Färbung kommen. Es wird empfohlen, bei solchen Streifen die Färbung vorzeitig zu beenden.

9.7 Abstoppen der Reaktion

1. Nach Absaugen der Substratlösung werden die Streifen dreimal kurz mit deionisiertem Wasser gewaschen.
2. Die Streifen werden vorsichtig mit einer Plastikpinzette aus dem Wasser entnommen und zum Trocknen für ca. 2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers gelegt. Anschließend können die Streifen auf dem beigelegten Auswertebogen aufgeklebt und die Ergebnisse protokolliert werden.
3. Die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden.

10. Zusammenfassung der Testdurchführung

1.	alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2.	in 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer die Streifen einlegen, die Streifen müssen komplett untergetaucht sein
3.	jeweils 20 µl von der Probe bzw. Kontrolle einpipettieren
4.	1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
5.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen
6.	2 ml gebrauchsfertige Konjugatlösung zugeben
7.	45 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren
8.	dreimal je 5 Minuten, mit je 2 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer, auf dem Schüttler waschen
9.	1,5 ml der Substratlösung zugeben; 5 - 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren. Sollbanden siehe 9.6
10.	mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser waschen
11.	2 Stunden zwischen 2 Lagen saugfähigen Papiers trocknen und das Ergebnis ablesen

11. Auswertung

11.1 Bewertung der Bandenintensität

1. Bei jeder Testdurchführung muss unabhängig von der Anzahl der Proben die Schwachpositiv Serumkontrolle und Negativ Kontrolle mitgeführt werden. Die Schwachpositiv Serumkontrolle dient zur Abgrenzung der Reaktivität von der Hintergrund-Reaktivität (Cutoff).
2. Notieren Sie im beigelegten Auswertebogen Datum, Chargen- und Röhrchen-Nummer, sowie die detektierte Antikörperklasse.
3. Tragen Sie die Proben-Identifizierungs-Nummern in das Protokollblatt ein.
4. Kleben Sie nun mit einem Klebestift die dazugehörigen Teststreifen in die entsprechenden Felder des Auswertebogens. Richten Sie dazu die Teststreifen mit der Reaktions-Kontrollbande an der eingezeichneten Markierungslinie aus. Kleben Sie dann mit einem durchsichtigen Klebeband die Teststreifen links von der Markierungslinie an. Flächiges Ankleben der ganzen Teststreifen mit Klebestift oder Klebeband kann zu Veränderungen der Färbung führen.
5. Den vorentwickelten Kontrollstreifen mit den markierten Antigenbanden zur Orientierung an die aufgeklebten Teststreifen legen, und die reagierenden Banden identifizieren. Der vorentwickelte Kontrollstreifen ist kitspezifisch und stammt aus demselben Nitrozellulose-Block wie die Teststreifen im Testkit. Die Molekulargewichte bzw. die Bezeichnungen der Antigenbanden sind markiert.
6. Die Bandenintensitäten auf dem Probenstreifen werden im Vergleich zur Schwachpositiv Kontrolle bewertet (s. 11.2 bzw. Tabelle 3) und in den Auswertebogen eingetragen.

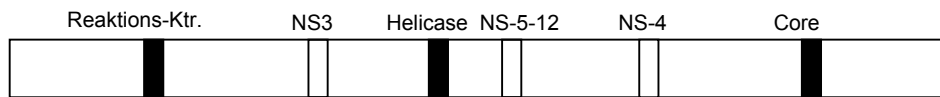
11.2 Kontrollergebnisse

Das Mitführen der Schwachpositiv Kontrolle ist unerlässlich. Dabei sollen die Testbedingungen (Sensitivität) geprüft und die Reaktivität mit den einzelnen Antigenbanden bestätigt werden. Die Lokalisation der Banden muss mit dem beigefügten Kontrollstreifen übereinstimmen.

Die Kontrollbande (Reaktions-Kontrolle) unterhalb der Streifennummer dient zur Überprüfung der Testdurchführung, und muss in jedem Fall eine deutliche Färbung zeigen.

Die mit der Schwachpositiv Serumkontrolle inkubierten Teststreifen sollen nachfolgende Bandenmuster aufzeigen.

- Schwachpositiv Kontrolle:**



Es sollten auf den *trockenen Streifen* zumindest die Core und Helicase-Bande erkennbar sein. Alle anderen Banden können ebenfalls schwach zu sehen sein. Im *nassen Zustand und während des Färbevorgangs* muss zumindest die Core-Bande schwach zu sehen sein. Alle anderen Banden können, aber müssen nicht zu sehen sein (siehe. 9.6)

- Negativ Kontrolle:**

Die Negativ Kontrolle zeigt keine Banden. Lediglich etwa 2-6 mm unterhalb der aufgetragenen Streifennummer muss die Kontrollbande sichtbar werden, die sich bei jeder Probe entwickelt und als Kontrolle der Serum-, Konjugat- und Substratzugabe dient.

Tabelle 3: Bandenintensität

Banden	Intensität
Negativ	-
schwache Intensität (gut sichtbar, aber schwächer als das Core-Antigen der Schwachpositiv Kontrolle)	+/-
gut sichtbare Intensität (entspricht dem Core-Antigen der Schwachpositiv Kontrolle)	+
starke Intensität (stärker als das Core-Antigen der Schwachpositiv Kontrolle)	2+

11.3 Testergebnisse und Testinterpretation

Zur sicheren und einfachen Testauswertung wurde auf Grund der Evaluierungen und einer mathematischen Analyse eine Punktbewertung der HCV-Antigene im *recomBlot HCV IgG 2.0* durchgeführt.

Das Testergebnis erhält man durch Addition der Punktwerte der einzelnen mit ±, + und ++ bewerteten Banden (Tabelle 4 und 5). Die resultierende Summe wird in die Spalte mit den Summenzeichen eingetragen. Die positive, fragliche oder negative Beurteilung der Probe kann dann direkt bestimmt und in die Spalte Beurteilung eingetragen werden.

Tabelle 4: Punktbewertung der HCV-Antigene im *recomBlot HCV IgG 2.0*

	+/-	+ und ++
NS3	0	3
Helicase	0	3
NS5-12	0	2
NS4	0	4
Core	5	8

Tabelle 5: Beurteilung der Testergebnisse

Summe der Punkte	Beurteilung
0 - 5	negativ
6 - 9	fraglich
> 9	positiv

11.4 Hinweise zur Interpretation

Es wird darauf hingewiesen, dass Abweichungen von der vorgeschriebenen Test-Prozedur zu Fehlbeurteilungen führen können. Die vorgeschriebenen Inkubationszeiten sind unbedingt einzuhalten.

Bei stark positiven Proben kann es zu einer Überreaktion mit den Antigenen auf den Streifen kommen. Dies kann sich in einem zusätzlichen Auftreten von Banden auswirken. Es wird empfohlen stark positive Proben in einer Verdünnung von 1:500 für den Test einzusetzen. Als Verdünnungsmedium kann der gebrauchsfertige Waschpuffer verwendet werden.

Patienten mit fraglichen Ergebnissen sollten in jedem Fall nach drei bis vier Wochen nach erneuter Abnahme nochmals getestet werden. Falls Proben mit isolierten Reaktionen gegen die NS-Antigene keine Veränderung der Reaktivitätsverteilung zeigen, ist es möglich, dass diese Reaktion durch kreuzreagierende Antikörper verursacht werden. Es könnte sich hierbei auch um den verbliebenen Titer einer lang zurückliegenden, abgelaufenen Infektion oder um eine unspezifische Reaktion mit einem der rekombinanten Antigene handeln.

Zur zusätzlichen Absicherung empfiehlt sich auch eine PCR-Untersuchung zum Nachweis des HCV-Genoms.

Die Korrelation zwischen positivem Antikörpernachweis und Infektiosität ist nicht möglich.

Negative Testergebnisse können eine HCV-Infektion nicht völlig ausschließen. So können, trotz positivem HCV-RNA-Nachweis, bei Hämodialysepatienten HCV-Antikörper möglicherweise nicht nachgewiesen werden (Hinrichsen et al., 2002; Bukh et al., 1993).

Dunkle Teststreifen: Manche Seren von Patienten können auf dem gesamten Nitrozellulose-Streifen eine dunkle, durchgängige oder gemusterte Färbung erzeugen (z.B. bei Seren von Patienten mit Milcheiweiß-Allergien). Hierfür sind unterschiedliche Faktoren aus dem jeweiligen Patienten-Serum verantwortlich. Die Auswertung dieser Streifen ist in der Regel nur mit Einschränkungen möglich. So sind z.B. "inverse" Banden (weisse Banden auf dunklem Hintergrund) als negativ zu werten. Das entsprechende Serum sollte in jedem Fall mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

12. Klinische Ergebnisse

Zur Evaluierung wurden insgesamt 1137 Seren mit dem *recomBlot HCV IgG 2.0* getestet. Das Kollektiv bestand aus 399 Blutspenderseren, 299 HCV-positiv vorbefundete Proben aus der Routinediagnostik, 18 Serokonversionen mit insgesamt 156 Seren, 50 Seren, die sich oft als problematisch in der Laborroutine erweisen (ikterische, hämolytische, lipämische und RF-positive Proben), 33 Seren mit Antikörpern gegen das Expressionssystem der rekombinanten Antigene und 200 klinischen Seren von Patienten mit EBV-Infektion (20 Stück), HEV-Infektion (22 Stück), Schwangeren (50 Stück), klinisch definierte Seren (30 Stück) und Routinelauferen (78 Stück).

	recomBlot HCV IgG 2.0			
	gesamt	negativ	fraglich	positiv
Blutspender	399	380	19	0
klinische Seren EBV-Infektionen und Schwangere, HEV-Patienten, klinisch definierte Seren, Routinelaufseren	200	191	6	3 ¹⁾
Problemseren in der Laborroutine ikterische, hämolytische, lipämische und RF-positive Seren	50	47	3	0
Seren mit Antikörpern gegen das Expressionssystem der rekombinanten Antigene	33	33	0	0
Seren aus der HCV - Routinediagnostik	299	1 ²⁾	1	297
Serokonversionen (18 Verläufe)	156	39	20	97
Gesamt	1137	691	49	397

1) Die drei positiven Ergebnisse konnten in Vergleichstests bestätigt werden.

2) Das Serum ist im ELISA schwachpositiv, in der PCR positiv und in mehreren Bestätigungstests negativ. Laut des externen Gutachters beinhalteten die Seren aus der Routinediagnostik auch Hämodialysepatienten, die, wie unter 11.4 beschrieben, negative HCV-Antikörper-Befunde liefern können.

Die Testung der 18 Serokonversionen mit durchschnittlich 7-8 Abnahmen ergaben, dass der *recomBlot* HCV IgG 2.0 bereits bei teilweise negativem oder nur schwach positivem Enzymimmuntest ein fragliches oder positives Ergebnis zeigte. Er weist in der Regel mindestens die Empfindlichkeit vergleichbarer Bestätigungstests auf.

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die Seren mit eindeutig definiertem HCV-Status (festgelegt durch übereinstimmende Vergleichstestungen) verwendet.

recomBlot HCV IgG 2.0	HCV-Status definiert		HCV-Status nicht definiert	gesamt
	negativ	positiv		
negativ	605	1 ²⁾	85	691
positiv	0	300	97	397
fraglich	22	1	26	49
gesamt	627	302	208	1137

Sensitivität: $300/(300+2) \times 100 = 99,3\%$

Spezifität: $605/(22+605) \times 100 = 96,5\%$

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 3. Auf Anforderung senden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur HCV-Diagnostik zu.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 3.

recomBlot HCV IgG 2.0

Immunoblot test with recombinant antigens separated by gel electrophoresis, for the determination of IgG antibodies against the **Hepatitis C virus (HCV)** in human serum or plasma.

1. General aspects

recomBlot HCV IgG 2.0 is a qualitative *in vitro* test for the determination and identification of IgG antibodies against Hepatitis C virus in human serum or plasma. In contrast to ELISAs or Spottests the test permits a statement about the specific antibodies assigned to different stages of infection by the electrophoretical separation of the antigens. The **recomBlot HCV IgG 2.0** is used to confirm results for samples that have tested positive in screening assays.

2. Hepatitis C virus

Before its identification, the hepatitis C virus was classified as the so-called nonA/nonB hepatitis viruses that cause most of the cases of hepatitis transmitted by blood transfusions and by other blood products. Cases of nonA/nonB hepatitis are characterised by an incubation period of 2 to 26 weeks (average: 8 weeks) and, in most cases, a relatively mild course in the acute phase. As many as 80% of patients develop a chronic hepatitis, which in some cases results in a liver cirrhosis or primary hepatic cell carcinoma. The number of chronically infected persons world-wide is estimated at 170 million. The prevalence level in Germany is 0.6%.

The causative infective agent of this hepatitis type was identified in 1989 as a single-strand RNA virus, which was then designated as the hepatitis C virus (HCV). This pathogen belongs to the family of flaviviruses, which also includes the yellow fever and TBE (tick-borne encephalitis) viruses. Its genome has a length of 9.5 Kb and codes for one capsid protein (core), two membrane proteins (E1 and E2) and four non-structural proteins (NS2 to NS5).

2.1 Epidemiology and transmission

Until suitable testing methods were available, the hepatitis C virus caused 80 to 90% of nonA/nonB hepatitis infections. This virus infects only humans and is usually transmitted via blood transmissions or other blood products. One in every three to five thousand blood donations is positive. The risk of developing a clinical infection after receiving a dose of positive blood is about 75%.

80% of all new transmissions are now observed in drug addicts due to syringe and needle sharing. Other potential transmission routes include sexual intercourse and household contact with infected persons under poor hygienic conditions. Hospital staff are at risk from needle injuries. The virus can be transmitted from mother to child during pregnancy. The transmission route is unknown in about 30% of cases.

2.2 Pathogenesis and clinical aspects

The virus enters the bloodstream directly, usually in contaminated blood or blood products. It is transported to the liver by infected macrophages, where it infects and destroys hepatocytes. The result is a liver inflammation (hepatitis) with cellular necrosis.

About 75% of infections take an inapparent course, severe courses being rare exceptions. Chronic persistent or chronic reactive hepatitis develops in as many as 80% of all infected persons. In 10 to 20% of the chronic cases, cirrhosis of the liver eventually develops, and about 4% of these cases develop a primary hepatocellular carcinoma.

3. Diagnosis

The first step in laboratory diagnostics of a hepatitis C infection is the detection of specific antibodies against HCV proteins using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) screening tests. Then ELISA reactivity is confirmed by the more highly specific Western Blot test. The higher level of specificity of the latter test is achieved by separating the HCV antigens. Thereby their respective reactivity levels can be evaluated separately.

A positive result for HCV antibodies recommends the viral RNA detection using the NAT (nucleic acid amplification technique), for example RT/PCR. NAT should confirm or exclude virus persistence, which may result in therapeutic consequences. In the case of negative PCR coupled with confirmed antibody

detection, the RT/PCR should be repeated at intervals of a few months. Only then a relatively reliable conclusion can be drawn regarding the chronicity of a HCV infection.

Antibodies to HCV-specific antigens are usually detectable three to four weeks after a HCV infection. An exception is the "diagnostic window" during the incubation and very early acute phase of an infection. In that time the very low viral load delays the antibody response. Immunosuppressed patients and neonates with perinatal infections also show a "distorted" antibody picture (neonates due to antibodies from the mother). A confirmed diagnosis of these HCV infections is only possible by repeated positive detection of the HCV genome using the NAT.

4. Test principle

The purified recombinant antigens are separated by molecular weight via SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and subsequently transferred to nitrocellulose membrane electrophoretically (western blotting). Free binding sites on the membrane are saturated with a solution of proteins. Following this matrix is washed and cut into strips.

To facilitate detection of HCV-specific antibodies, the strips are incubated with the diluted serum sample, whereby the antibodies bind to the antigens on the strips. Unbound antibodies are then flushed away and the strips are incubated in a second step with anti-human IgG coupled with horse radish peroxidase. Specifically bound antibodies are detected by means of a colour reaction catalysed by the peroxidase. If reaction against one of the HCV-specific proteins has taken place, a dark band appears at the corresponding locus on the strip.

As reaction control, a band with anti-human immunoglobulin is also applied at the upper end of the strips (below the number) that must show a reaction to every serum.

The present immunoblot uses five recombinant produced HCV antigens:

NS-3:	Non-structural protein with activity of viral helicase and protease
Helicase:	Part of NS-3 with activity of viral helicase
NS-5-12:	Part of NS5 (RNA polymerase) of HCV
NS-4:	Unknown function, N-terminal part of NS-4
Core:	Capsid protein, forming the major part of the nucleocapsid

In order to avoid cross reactions and false positive results, the recombinant antigens are produced without any foreign protein.

5. Package contents

recomBlot HCV IgG 2.0

The reagents in a pack are sufficient for 20 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF 10 X	100 ml	Wash and dilution buffer (ten times the concentration) contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent and preservative
SUBS TMB	45 ml	Substrate solution Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
MILKPOW	5 g	Skim milk powder
INCUTRAY	2 pieces	Incubation trays with 10 wells each
CONTRSTR	1	Predeveloped control strip (kit specific)
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TESTSTR	2 pieces	Test tubes with 10 consecutively numbered western blot test strips coated with HCV antigens
CONTROL ± IgG	80 µl	Weak positive serum control (white screw cap) Human origin, anti HIV-1/2 and HBs-Ag negative, contains 0,1% MIT and 0,1% Oxypyrion
CONTROL - IgG	80 µl	Negative serum control (blue screw cap) Human origin, anti HIV-1/2, anti-HCV and HBs-Ag negative, contains 0,1% MIT and 0,1% Oxypyrion
CONJ IgG	60 µl	Anti-human IgG conjugate (green screw cap, thousand times the concentration) from rabbit, contains NaN ₃ (<0,1%)

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water, vacuum extraction system with disinfection trap, micro pipettes, plastic forceps, shaker, metric cylinder with graduations, scales.

7. Information on test and reagents

7.1 Precautions

- ☞ Control sera are from blood donors verified for the absence of antibodies to HIV 1/2 and Hepatitis Bs-antigen. Since an infection cannot be excluded with absolute certainty despite this precaution, the product must be treated with the same care as the patient samples.
- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates contain sodium azide. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least 1 hour.
- ☞ Use incubation trays once only.
- ☞ Handle strips carefully with a plastic forceps.

7.2 Handling information

Store reagents before and after use at 2°C - 8°C, **do not freeze**. Temper all components before starting the test for at least 30 minutes to 18°C - 25°C (room temperature). Both the test and incubation procedures are carried out at room temperature.

Mix the control sera and concentrated conjugates well before use. Mix the patient sera well before use as well.

Do not open the tube containing the test strips until just before use to avoid condensation of water. The strips that are not used must be left in the tube and stored further at 2°C - 8°C (reclose tube tightly, test strips must not become moist before testing!).

Weak positive and negative controls must always be run parallel to the sera being tested, regardless of how many are being tested. This is the only way to ensure correct test interpretation.

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Only reagents with lot numbers corresponding to the respective lot number on the label of the kit package may be used.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3 Preparation of solutions

7.3.1 Preparation of ready-to-use wash buffer

This buffer is used for both serum and conjugate dilution as well as for the washing steps.

Prior to dilution, the volume of wash buffer required for the corresponding number of tests must be determined.

The skim milk powder is first dissolved in wash buffer concentrate. This mixture is then filled up with deionised water to the final volume (dilution: 1 + 9). See Table 1 for the amounts required. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

Table 1: Wash buffer per test strip used

Test strips used	Skim milk powder	Wash buffer concentrate	Deionised water	Ready-to-use wash buffer
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml

7.3.2 Preparation of conjugate solution

The conjugate solution for the IgG test is to be prepared immediately before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of IgG conjugate concentrate is diluted with 1000 parts of ready-to-use wash buffer (1 + 1000).

The amounts used are listed in Table 2. Volumes for numbers of test strips not listed in the table have to be determined by calculation.

Table 2: Volumes for anti-human IgG conjugate dilution

Test strips used	IgG conjugate concentrate	Ready-to-use wash buffer
1	2 µl	2 ml
2	4 µl	4 ml
3	6 µl	6 ml
5	10 µl	10 ml
10	20 µl	20 ml
15	30 µl	30 ml
20	40 µl	40 ml

* The volumes have been calculated without dead volume. Depending on handling (manually or by machine processing) please prepare conjugate solution for additional 1 to 3 strips.

7.3.3 Substrate solution

The substrate is ready for use! Bring to room temperature (18°C - 25°C) before starting the colour reaction.

Avoid contamination of the unused substrate solution by nonsterile pipette tips etc. at all costs since this may affect test sensitivity.

7.4 Storage and stability

Store reagents at 2°C - 8°C before and after use.

Ready-to-use wash buffer can be stored at 2°C - 8°C for four weeks.

The conjugate solution is to be prepared always freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. Heat-inactivated samples may result in raised background reaction levels. A microbial contamination of the sample is to be avoided at all costs. Insoluble substances are to be removed from the sample prior to incubation by means of centrifugation.

Use of lipaemic, haemolytic or icteric samples did not result in incorrectly evaluated data (see 12). Therefore these sera can be analysed by the *recomBlot* HCV IgG 2.0. Please consider the possibility of dark background which may be generated by these sera on the whole nitrocellulose strip.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C-8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or colder. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1 General

The reproducibility of the results depends to a great extent on consistent washing of the strips. The washing frequencies described under 9.3. and 9.5 should therefore always be maintained.

9.2 Incubation of samples

1. One well in the incubation tray (see 6) is required per sample to be tested. **2 ml** of ready-to-use wash buffer is pipetted into each well. Then one test strip is carefully dipped into each of the wells filled with ready-to-use wash buffer using a plastic forceps. The strip number must face upwards.

Important!

The strip must be completely wet and immersed in the wash buffer.

Record the tube and strip numbers used on the evaluation sheet.

2. Adding the samples

IgG test procedure: 20 µl of an undiluted sample (human serum or plasma) or of the corresponding weak positive control resp. negative control, are pipetted into the proper wells (**dilution 1 + 100**).

Please be sure to add the sample at one end of the immersed strips into the wash buffer and mix as soon as possible by shaking the tray carefully.

Record the sample numbers on the evaluation sheet.

Cover the incubation tray with the plastic lid and incubate for **1 hour** at room temperature while shaking gently.

Important!

Make sure the incubation solutions are not carried over into other wells; be particularly careful to avoid splashing when opening and closing the lid (risk of cross-contamination).

9.3 Washing

1. Following incubation, the plastic lids are carefully removed from the incubation trays.
2. The serum dilution is carefully aspirated from the individual wells.

Important!

When the solutions have been aspirated from a well, the pipette tip has to be changed or rinsed well with deionised water after each aspiration procedure to prevent cross-contamination.

In the case of machine processing the references of the equipment manufacturer have to be considered.

3. Then place **2 ml** of the ready-to-use wash buffer in each well and wash on the shaker while shaking gently for **5 minutes**. The wash buffer is aspirated after the washing procedure.
4. Carry out the washing step under 3. a total of **three times**.

9.4 Incubation with peroxidase conjugate

After washing the strips, place **2 ml** of the appropriately prepared **conjugate solution** (see Table 2). into each well and incubate for **45 minutes** while shaking gently at room temperature, whereby the incubation tray is covered with the plastic lid.

9.5 Washing

The conjugate solutions are aspirated from the wells and the strips are washed again (see 9.3).

9.6 Substrate reaction

Add **1.5 ml substrate solution** into each well and incubate for **5 - 15 minutes**, shaking gently and under observation, at room temperature.

Important!

Observe the colour reaction process and leave all strips in the substrate solution until the strips incubated with the weak positive serum control shows the core band at least. Further band can also appear on the wet strip (s. 11.2)!

The colour reaction may be excessive with highly positive sera. Recommendation: Stop the colour reaction earlier in such strips.

9.7 Stopping the reaction

1. After the solution is aspirated, wash the strips briefly **three times with deionised water**.
2. Use a plastic forceps to remove the strips carefully from the water and place them between 2 layers of absorbent paper to dry for about 2 hours. The strips may be adhesively attached to the enclosed evaluation sheet and the results may be recorded.
3. The strips should be stored protected from exposure to light.

10. Summary of the test procedure

1.	bring all reagents to room temperature
2.	deposit the strips in 2 ml ready-to-use wash buffer and take care that they are completely immersed in the ready-to-use wash buffer
3.	add 20 µl of patient sample resp. control serum
4.	incubate for 1 hour at room temperature while shaking gently
5.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer for 5 minutes each time
6.	add 2 ml appropriately prepared conjugate solution
7.	incubate at room temperature for 45 minutes while shaking gently
8.	wash on the shaker three times with 2 ml of ready-to-use wash buffer for 5 minutes each time
9.	add 1.5 ml of the substrate solution, incubate while shaking at room temperature for 5 – 15 minutes. Bands see 9.6
10.	wash the strips at least three times with deionised water
11.	dry the strips between 2 layers of absorbent paper for 2 hours and read off the result

11. Evaluation

11.1 Evaluation of band intensity

1. A weak positive control and negative control must be included in each test run, irrespective of the number of samples. The reactivity of the weak positive control serves as cutoff and as a discrimination from the background reactivity.
2. On the attached evaluation sheet, record the date, batch and tube number, and the detected antibody class.
3. Enter the sample identification number on the protocol sheet.
4. Now attach the corresponding test strips with a glue stick into the corresponding fields of the evaluation sheet. To do this, place the test strips with the reaction control band on the marking lines. Then use clear adhesive tape to attach the test strips left from the marking line. Complete sticking of the test strip with glue or adhesive tape may lead to aberrations of the colouring.
5. Place the predeveloped control test strip with the labelled antigen bands on the fixed test strips in such a way that the reaction control bands are aligned. The predeveloped test strip is kit specific and comes from the same nitrocellulose sheet as the test strips in the test kit. The molecular weights and names of the antigen bands are marked.
6. Band intensities are assessed by comparison with the weak positive control (refer to 11.2 resp. Table 4). Please record the values in the evaluation sheet.

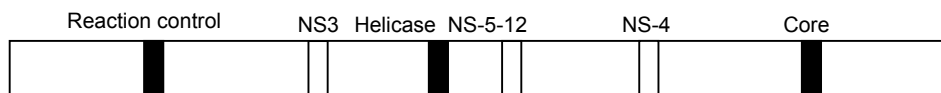
11.2 Control results

Weak positive controls must always be run parallel to the sera being tested. The test conditions (sensitivity) are to be examined and reactivity with the individual antigen bands are to be confirmed. The localisation of the antigen bands must agree with the attached control strip (kit specific).

The control band (reaction control) below the strip number is used to check the correct performance of the test. This band must show a distinct colouring.

The test strips incubated with the weak positive serum control show the following band patterns.

- Weak positive control**



The reactivity of the weak positive control serves as sensitivity check and as cutoff. The dry strip must show the reaction control band, Helicase and core. Further bands may also appear. In the *wet state* and during the *staining process*, at least the core band should be weakly visible. All of the other bands may appear (see 9.6).

- Negative control:**

The negative control does not show any band patterns. The reaction control must only be seen (circa 2 - 6 mm below the identification number of each strip). The reaction control serves as a control for the proper incubation of serum, conjugate and substrate.

Table 3: Band intensity

Bands	Intensity
Negative	-
Weak intensity (visibly, but weaker than the core antigen of the weak positive control)	+/-
Intensity well visible (same intensity as with the core-antigen of the weak positive control)	+
Strong intensity (stronger intensity as with the weak positive control)	2+

11.3 Test results and test interpretation

As a basis for reliable and simplified test evaluation, band specific point values for the determination of the test results were established. The point values of the HCV antigens in the *recomBlot HCV IgG 2.0* based on the clinical evaluations and mathematical analysis.

The test result is obtained by the addition of the point values of the separate bands, that are determined as ±, + or ++ (Table 4 and Table 5). The resulting total of points is entered into the column marked with the sign for sums. The positive, questionable or negative evaluation of the sample can then be directly determined and entered into the evaluation column.

Table 4: Point values of the HCV antigens of the *recomBlot HCV IgG 2.0*

	+/-	+ and ++
NS3	0	3
Helicase	0	3
NS5-12	0	2
NS4	0	4
Core	5	8

Table 5: Interpretation of the test results

Sum of points	Evaluation
0 - 5	negative
6 - 9	borderline
> 9	positive

11.4 Directions for Interpretation

It should be noted, that deviations from the test procedure may lead to misinterpretation. The given incubation times must be strictly observed.

Strong positive samples may show an overreaction with the antigens on the strips, resulting in a strong colour reaction. Additional bands may occur as well. It is therefore recommended to repeat the test in cases of strong positive samples with a dilution of 1:500. Dilution in ready-to-use wash buffer.

Samples with borderline results have to be retested with a freshly obtained serum sample after three to four weeks. If samples with isolated reactions against NS-antigens do not show any change, it might be caused by cross reactions. Furthermore it may indicate a residual titer of a past infection or an unspecific reaction with the recombinant antigens.

For confirmation of a positive test result, NAT (e.g. PCR) is recommended for the detection of the HCV genome.

There is no correlation between positive detection of HCV antibodies and infectiousness.

Negative test results do not exclude a virus infection. It is possible that HCV antibodies may not be detected in haemodialysed patients despite positive test results for HCV RNA (Hinrichsen et al., 2002; Bukh et al., 1993).

Dark test strips: A few sera of patients may generate a dark general or patterned colouring on the whole nitrocellulose strip (e.g. sera of patients with milk protein allergies). Different factors according to the patient serum are responsible for this phenomenon. The evaluation of these strips is usually possible only with some restrictions. E.g. "inverse" bands (white bands on dark background) are assessed as negative. The corresponding serum should strictly be retested by use of other serological methods.

12. Clinical results

A total of 1,137 sera were tested with the *recomBlot* HCV IgG 2.0 for clinical evaluation. The collective comprised different panels of sera: 399 blood donor sera, 299 HCV-positive sera, pre-tested samples from routine diagnostic procedures, 18 seroconversions (with a total of 156 sera), 50 potentially interfering samples (icteric, haemolytic, lipaemic and RF-positive samples), 33 sera with antibodies against the recombinant antigen expression system and 200 clinical sera from patients with EBV infections (n = 20), HEV infections (n = 22), pregnancy (n = 50), clinically defined sera (n = 30) and routine diagnostics sera (n = 78).

	recomBlot HCV IgG 2.0			
	total	negative	indeterminate	positive
Blood donors	399	380	19	0
Clinical sera EBV infections, pregnancy sera, HEV patients, clinically determined sera, sera of routine diagnostics	200	191	6	3 ¹⁾
Potentially interfering sera (icteric, haemolytic, lipaemic and RF-positive samples)	50	47	3	0
Sera with antibodies against the recombinant antigen expression system	33	33	0	0
HCV-positive, pretested samples	299	1 ²⁾	1	297
Seroconversions (18 courses)	156	39	20	97
Total	1137	691	49	397

1) Positive results were confirmed by comparative assays.

2) The serum is weak positive in the ELISA, positive in PCR and negative in several confirmatory tests. According to the external referee, the sera from routine diagnostics also include haemodialysis patients with positive PCR results and negative HCV antibody titer (11.4).

Testing of the 18 seroconversions, with an average of 7-8 samplings, showed that *recomBlot* HCV IgG 2.0 results in indeterminate or positive interpretations, whereas ELISA are still negative or only weakly positive. The *recomBlot* HCV IgG 2.0 shows the sensitivity level of comparable confirmatory tests at least.

Sera with a confirmed HCV status (i.e. with corresponding comparative test results) were used in calculation of sensitivity and specificity.

recomBlot HCV IgG 2.0	HCV status well defined		HCV status not defined	total
	negative	positive		
negative	605	1 ²⁾	85	691
positive	0	300	97	397
borderline	22	1	26	49
total	627	302	208	1137

Sensitivity: $300/(300+2) \times 100 = 99,3\%$






Specificity: $605/(22+605) \times 100 = 96,5\%$

13. Literature

- (1) Epidemiologisches Bulletin: Virushepatitis B und C zum Jahre 2000 Robert Koch Institut, 14. Juni 2002 / Nr. 24
- (2) H. Hinrichsen, G. Leimenstoll, G. Stegen, H. Schrader, U.R. Folsch, W.E. Schmitt: Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in haemodialysis patients: a multicentre study in 2796 patients. *Gut* (2002 Sep), 51(3), 429-433
- (3) E. Schreier, M. Höhne: Hepatitis C-Epidemiologie und Prävention. *Bundesgesundheitsblatt*, 2001, 44: 554-561, Springer Verlag
- (4) EASL International Consensus Conference on Hepatitis C Paris, 26-28 February 1999. *Journal of Hepatology* 1999; 30: 956-961
- (5) Europäischer Konsens zu Hepatitis C: Epidemiologie, Diagnose und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt Heft 50* 17.12.99.
- (6) R. S. Roß, S. Viazov, M. Roggendorf: Möglichkeiten und Grenzen der gegenwärtigen Hepatitis C-Virus-Diagnostik. *BIOforum* 11/98, 697-701
- (7) H. E. Blum: Hepatitis C: Aktuelle Aspekte. *Hygiene und Mikrobiologie* 3/98
- (8) Hanns F. Lühr, Guido Gerken, Michael Roth, Sandra Weyer, Jörg F. Schlaak and Karl-Hermann Meyer zum Büschenfelde: The cellular immune responses induced in the follow-up of interferon- α treated patients with chronic hepatitis C may determine the therapy outcome. *Journal of Hepatology* 1998; 29; 524-532
- (9) M. Putzker: Die Hepatitis-C-Virus Infektion. *mta* 12 (1997) 11, 794-798
- (10) Scarselli, A. Urbani, A. Sbardellati, Licia Tomel, R. de Francesco, C Traboni: GB Virus B and Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteases share Substrate Specificity. *Journal of virology*, (1997), Vol 71, Nr. 7, 4985 - 4989
- (11) B. C. A. Langer, H. Nitschko, G.G. Frösner: Hepatitis-C-Diagnostik: Aussagekraft von Anti-HCV-Suchtest, quantitativem Anti-HCV-Test, Anti-HCV-IgM-Test, Immunoblot zur Bestätigung, PCR zum direktem Nachweis der Virusnukleinsäure, HCV-Genotypisierung und Quantifizierung der HCV-RNS. *Moderne Hepatitisdiagnostik*, Gerd Frösner (Hrsg), Kilian Verlag 1996, 59-77
- (12) Hsiang Ju Lin, J. Y.N. Lau, Ian J.Lauder, Naiyi Shi, Ching-Lung Lai, F. B. Hollinger: The hepatitis C virus genome: a guide to its conserved sequences and candidate epitopes. *Virus Research* (1993), 30, 27-41
- (13) J. Bukh, P. Wantzin, K. Krogsgaard, F. Knudsen, R.H. Purcell, R.H. Miller: High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *Copenhagen Dialysis HCV Study Group. J. Infect. Dis.* (1993 Dec.), 186(6), 1343-1348
- (14) Q. L. Choo, K. H. Richman, J. H. Han, K. Berger, C. Lee, C. Dong, C. Gallegos, D. Coit, A. Medina-Selby, P. J. Barr, A. J. Weiner, D. W. Bradley, G. Kuo, M. Houghton: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1991), 88, 2451-2455
- (15) H. Miller, R. H. Purcell: Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1990), 87, 2057-2061

We will be pleased to send you further literature on HCV diagnostics at your request.

14. Explanations of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests amount of tests	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze Anzahl der Ansätze
EVALFORM	Evaluation form	Auswertebogen
INSTRU	Instructions for use	Gebrauchsinformation
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomBlot HCV IgG 2.0

Artikel-Nr./ Article No.: 4302

Gebrauchsinformation/ Instructions for use: GIRBHC020ADE.DOC

gültig ab/ valid from: Juli/July2005

MIKROGEN GmbH
 Floriansbogen 2-4
 D-82061 Neuried
 Germany
 www.mikrogen.de

Tel: +49 (0)89 54 80 1-0
 Fax: +49 (0)89 54 80 1-100
 mikrogen@mikrogen.de

QM-SYSTEM zertifiziert durch:
 QM System certified according to:



