

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНИХ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ГЕПАТИТУ Е

HEV Ab Version ULTRA

Кат. №: **EVABULTRA.CE**

Дата випуску інструкції: **01-2020**

Версія: **2**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпасти.

Імуноферментний аналіз для визначення загальних антитіл до Вірусу Гепатиту Е в сироватці та плазмі

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення загальних антитіл до Вірусу Гепатиту Е (HEV) у сироватці та плазмі. Набір призначений для спостереження за пацієнтами, інфікованими HEV, та скринінгу одиниць крові.

Крім того, завдяки конфігурації аналізу продукту, набір може також використовуватися для тестування загальних антитіл до HEV в сироватці та плазмі, отриманих від інших реципієнтів, що не є людьми, для зоонозних досліджень.

Тільки для діагностики *in vitro*.

В. ВСТУП

Вірус гепатиту Е або HEV є нещодавно відкритим агентом вірусного гепатиту, що передається кишково-розчинним шляхом. HEV – це одноланцюговий РНК-вірус без оболонки; після того, як він був тимчасово віднесений до сімейства *Caliciviridae*, HEV був перекласифікований як єдиний представник роду *Hepevirus*, сімейства *Hepeviridae*, у 2004 році. HEV виявляється в калі інфікованих пацієнтів. і присутній в 4 штаммах (1, 2, 3 і 4), по-різному поширений географічно та є вірулентним.

HEV є серйозною проблемою в багатьох країнах, що розвиваються, оскільки в 1955 році в Нью-Делі, Індія, повідомили про його перший спалах.

Виявлено високий рівень летальних випадків серед вагітних жінок і носіїв хронічного гепатиту.

Клонування та секвенування геному HEV привели до розробки серологічних тестів для виявлення антитіл анти-HEV на основі рекомбінантних імунодомінантних антигенів, отриманих з консервативних областей чотирьох штамів вірусу.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті високоспецифічним синтетичним антигеном, що кодує консервативні та імунодомінантні детермінанти HEV.

Тверду фазу спочатку обробляють зразком, де загальні антитіла анти-HEV (переважно IgG, IgM та IgA) захоплюються антигенами, якщо вони присутні.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти-HEV загальні антитіла виявляються додаванням того ж високоспецифічного синтетичного антигену HEV, міченого пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл анти-HEV, присутніх у зразку. Після блокування ферментативної реакції її оптичну щільність вимірюють за допомогою зчитувача ІФА.

Версія ULTRA особливо підходить для автоматизованих скринінгів.

Д. КОМПОНЕНТИ

Стандартна конфігурація набору містить достатню кількість реагентів для виконання 192 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

x2 мікропланшети. 12 смужок x 8 мікролунок. Мікропланшети покриті високоспецифічним синтетичним антигеном HEV. Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 4 °C (°C).

2. Негативний контроль: CONTROL -

1x4.0 мл (мл). Готовий до використання контроль. Він містить бичачі носії білків, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4 ± 0.1, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300. Кодується жовтуватим кольором.

3. Позитивний контроль: CONTROL +

1x4.0 мл (мл). Готовий до використання контроль. Він містить бичачі носії білків, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4 ± 0.1, інактивовану сироватку людини, позитивну на HEV Ab та негативну на маркери HBsAg, ВІЛ, сифілісу та HCV, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300. Кодується зеленим кольором.

4. Калібратор: CAL ...мл (мл)

x 2 флакони. Ліофілізований калібратор. Розчиняється з об'ємом води класу EIA, зазначеним на етикетці. Містить білки фетальної бичачої сироватки, людські антитіла до HEV, вміст яких відкалібровано за допомогою 1-го референтного реагенту BOO3 на антитіла до HEV, код NIBSC 95/584, **1 МО/мл (IU/ml) ± 20%**, 10 мМ (mM) Na-цитратний буфер pH 6.0 ± 0.1, 0.3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консервант.

Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.

5. Концентрат промивного буфера: WASHBUF 20X

2x60 мл/пляшка (ml/bottle) 20X концентрований розчин, що містить 0.045% ProClin 300 як консервант. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2 та 0.05% Tween 20.

6. Ферментний кон'югат: CONJ

1x25.0 мл/пляшка (ml/bottle). Готовий до використання розчин, містить HEV-специфічний синтетичний антиген, мічений HRP, 5% BSA, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.8 ± 0.1, 0.3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Кодований рожево-червоним кольором.

7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x25 мл/пляшка (ml/bottle). Готовий до використання компонент. Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буфер, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметилбензидину або TMB і 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

8. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M (M)

1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H₂SO₄.
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).

9. Ущільнювальна фольга для планшета x 4 шт.

10. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Важлива примітка: Dia.Pro може постачати реагенти для 96, 480, 960 тестів лише за спеціальним запитом, як зазначено нижче:

| Кількість тестів | 96 | 480 | 960 |
|----------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Код | EVABULTRA.CE.96 | EVABULTRA.CE.480 | EVABULTRA.CE.960 |
| 1. Мікропланшет | x1 | x5 | x10 |
| 2. Негативний контроль | 1x2.0 мл (мл)/флакон | 1x10 мл (мл)/флакон | 1x20 мл (мл)/флакон |
| 3. Позитивний контроль | 1x2.0 мл (мл)/флакон | 1x10 мл (мл)/флакон | 1x20 мл (мл)/флакон |
| 4. Калібратор | x1 флакон | x5 флаконів | x10 флаконів |
| 5. Конц. Промивного буфера | 1x60 мл (мл)/пляшка | 5x60 мл (мл)/пляшка | 4x150 мл (мл)/пляшка |
| 6. Ферментний Кон'югат | 1x16 мл (мл)/флакон | 2x40 мл (мл)/пляшка | 4x40 мл (мл)/пляшка |
| 7. Хромоген/Субстрат | 1x16 мл (мл)/флакон | 2x40 мл (мл)/пляшка | 4x40 мл (мл)/пляшка |
| 8. Сірчана кислота | 1x15 мл (мл)/флакон | 2x40 мл (мл)/пляшка | 2x80 мл (мл)/пляшка |
| 9. Ущільнювальна плівка | x2 | x10 | x20 |
| 10. Інструкція | x1 | x1 | x1 |

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (200 мкл (µl) та 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА, встановлений на +37 °C (°C).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).

7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я або аналогічним органом) для проведення цього типу аналізу.
3. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
4. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
5. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Захищайте Хромоген/Субстрат від сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенда, де проводиться тест.
6. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
7. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
8. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
9. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
11. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах).
12. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
13. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
14. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
15. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
16. Сірчана кислота є подразнюючою. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азид натрію, оскільки ця хімічна речовина вплине на ферментативну активність кон'югату.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування, коли набір використовується для скринінгу одиниць крові.
4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва. У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при + 2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишилися, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не змінює колір з жовтого на зелений.

Негативний та Позитивний Контролі:

Готові до використання. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

Навіть якщо HEV-позитивний матеріал, використаний для отримання позитивного контролю, був хімічно інактивованій і отриманий з негативного на HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb і Syph Ab матеріалу, поведіться з таким контролем як з потенційно інфекційним.

Калібратор:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Важливі примітки:

- *Калібратор після розчинення стабільний при +2.8 °C (°C) протягом 1 місяця за умови правильного поводження. Для тривалого зберігання зберігайте в замороженому вигляді в аліквотах при -20 °C (°C) і розморожуйте лише один раз.*
- *Навіть якщо HEV-позитивний матеріал, використаний для отримання позитивного контролю, був хімічно інактивованій і отриманий з негативного на HBsAg/HIVAb&Ag/HCVAb і Syph Ab матеріалу, поведіться з таким контролем як з потенційно інфекційним.*

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20х бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денца на кришку.

Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °C (°C).

Ферментний кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте забруднення рідини окислювальними хімічними речовинами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент необхідно перенести, використовуйте лише пластикові та, можливо, стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами. Не піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикову, доступну стерильну одноразову тару.

Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подрознююча речовина (H315, H319, P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Легенда:

Попереджувальні Н-фрази:

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні Р-фрази:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

I. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

- Мікропіпетки** повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%.
- Інкубатор ІФА** слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА і забезпечується правильна температура +37 °C (°C) для мікропланшета.
- Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід інтенсивно праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 М (М) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку (μ/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
- Час інкубації** має допуск +/- 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА** повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему

зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.

- При використанні **автоматизованої робочої станції ІФА** всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендуються використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
- При використанні автоматичних пристроїв ІФА, якщо тримач для флаконів приладу не підходить до флаконів, що входять до набору, перенесіть розчин у відповідні контейнери та промаркуйте їх такою ж етикеткою, яка була відірвана від оригінального флакона. Ця операція важлива для уникнення невідповідності вмісту флаконів під час їх перенесення. Коли випробування закінчено, поверніть вторинні марковані контейнери до 2.8 °C (°C), щільно закупоривши.
- Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором, наприклад платформи ІФА **DIA.BLOod**, наданої DiaPro, вже перевіреної для лінійки продуктів DiaPro.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролито рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
- Розведіть весь вміст 20x концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Розчиніть Калібратор, як описано вище.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
- Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
- Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче, з обережністю, щоб підтримувати однаковий час інкубації для всіх зразків під час тестування.

Автоматичний аналіз:

У випадку, якщо тест виконується автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо внести зразок безпосередньо у відповідну лунку для зразка мікропланшета. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення між зразками.

Не розбавляйте контролі/калібратор, оскільки вони готові до використання.

Внесіть по 100 мкл (μl) контролів/калібратора у відповідні контрольні/калібрувальні лунки.

Важлива примітка: Візуально стежте за тим, щоб зразки були подані у відповідні лунки.

Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій, наведених нижче для ручного аналізу.

Настійно рекомендується переконаватися, що проміжок часу між подачею першого та останнього зразка буде розраховано приладом і враховано, відповідно відстрочивши першу операцію промивання.

Якщо використовується автоматична робоча станція, спочатку переконайтеся, що прилад перевірений згідно з пунктом I.6.

Ручний аналіз:

- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Зберігайте решту смужок в пакеті з осушувачем при 2.8 °C (°C), герметично запечатаними.
- Залиште лунку A1 порожньою для операції бланкування. Внесіть 100 мкл (μl) Негативного Контролю в трьох примірниках і 100 мкл (μl) Позитивного Контролю в одному екземплярі у відповідні лунки. Потім внесіть 100 мкл (μl) зразків у відповідні лунки для зразків. У разі використання Калібратора (*) внесіть 100 мкл (μl) його у відповідну лунку в двох примірниках. Не розбавляйте Контролі і Калібратор, оскільки вони попередньо розведені, готові до використання!
Перевірте наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця в кольорі між порожньою і повною лункою) або зчитуванням при 450/620 нм (nm). (Зразки показують значення OD вище 0.100).

Важливе зауваження: Смужки повинні бути заклені клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **45 хвилин при + 37 °C (°C)**.
- Промийте мікропланшет з автоматичним вошером, як описано в розділі I.3.
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату в усі лунки, окрім 1-ої лунки для бланкування та накрійте планшет. Переконайтеся, що цей компонент рожевого/червоного кольору був поданий у всі лунки, крім A1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим Кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 45 хвилин**.
- Промийте мікропланшет з автоматичним вошером, як описано в кроці 4.
- У кожен лунку внесіть піпеткою 100 мкл (μl) Хромоген/Субстрат, включаючи лунку для бланкування. Перевірте, чи правильно додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C) протягом 15 хвилин**.

Важливе зауваження: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 8 щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить позитивний контроль і позитивні зразки з синього на жовто-коричневий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину як описано в розділі I.5, за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язкове), бланкуючи прилад на A1.

Важливі загальні зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його

додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

- Було доведено, що струшування зі швидкістю 350 ± 150 об/хв (rpm) під час інкубації підвищує чутливість аналізу приблизно на 20%.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

| Метод | Операції |
|----------------------------|--|
| Контролі та Калібратор (*) | 100 мкл (μl) |
| Зразки розведені | 100 мкл (μl) |
| 1-а інкубація | 45 хвилин |
| Температура | +37 °C (°C) |
| Крок промивання | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування |
| Ферментний кон'югат | 100 мкл (μl) |
| 2-а інкубація | 45 хвилин |
| Температура | +37 °C (°C) |
| Крок промивання | 5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування |
| Хромоген/Субстрат | 100 мкл (μl) |
| 3-я інкубація | 15 хвилин |
| Температура | кімнатна |
| Сірчана кислота | 100 мкл (μl) |
| Зчитування ОЦ | 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) |

(*) Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-Off, тому він не впливає на обчислення результатів тесту.
- Калібратор (CAL) можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

| | | Мікропланшет | | | | | | | | | | | |
|---|-----|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | BLK | S 4 | | | | | | | | | | | |
| B | NC | S 5 | | | | | | | | | | | |
| C | NC | S 6 | | | | | | | | | | | |
| D | NC | S 7 | | | | | | | | | | | |
| E | PC | S 8 | | | | | | | | | | | |
| F | S 1 | S 9 | | | | | | | | | | | |
| G | S 2 | S 10 | | | | | | | | | | | |
| H | S 3 | S 11 | | | | | | | | | | | |

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний контроль PC = Позитивний контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка контролю проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають їхні значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) очікуваним та зазначеним в таблиці нижче.

| Параметри | Вимоги |
|--------------------------|---|
| Бланк-лунка | < 0.100 OD450 нм (nm) |
| Негативний контроль (NC) | < 0.150 середнього значення OD450 нм (nm) після бланкування |
| Позитивний контроль (PC) | > 0.1000 значення OD450 нм (nm) |

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

| Проблема | Перевірити |
|--|--|
| Бланк-лунка > 0.100 OD450 нм (nm) | 1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу |
| Негативний контроль (NC) > 0.150 OD450 нм (nm) після бланкування | 1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення |

| | |
|--|--|
| | <p>позитивного контролю замість негативного);</p> <p>4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або кон'югату;</p> <p>5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або кон'югатом;</p> <p>6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.</p> |
| Позитивний контроль < 0.1000 OD450 nm (nm) | <p>1. чи процедура була правильно виконана;</p> <p>2. що жодної помилки не було зроблено в розподілі контролів (видача негативного контролю замість позитивного контролю. У цьому випадку негативний контроль також матиме значення OD450 nm (nm) > 0.150;</p> <p>3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні;</p> <p>4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.</p> |

Якщо такі проблеми виникають, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

Важлива примітка:

Якщо використовувався калібратор, перевірте такі дані:

| Проблема | Перевірити |
|------------|------------|
| Калібратор | S/CO > 1.5 |

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, необхідно діяти таким чином:

| Проблема | Перевірити |
|---------------------------------|---|
| Калібратор S/CO < 1.5 | <p>1. чи процедура була правильно виконана;</p> <p>2. що жодної помилки не було зроблено в розподілі контролів (видача негативного контролю замість Калібратора);</p> <p>3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні;</p> <p>4. чи не відбулося зовнішнього забруднення Калібратора.</p> |

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, Негативний контроль, Позитивний контроль) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, виконуючи крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 10.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань розраховуються за допомогою граничного значення, визначеного за такою формулою для середнього значення OD450 nm (nm)/620-630 nm (nm) для Негативного Контролю (NC):

$$NC + 0.250 = \text{Cut-Off (Co)}$$

Значення, знайдене для тесту, використовується для інтерпретації результатів, як описано в наступному параграфі.

Важлива примітка: Коли розрахунок результатів виконується операційною системою автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для розрахунку граничного значення та правильної інтерпретації результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 nm (nm)/620-630 nm (nm) зразка і граничного значення Cut-off (Co), або S/Co, відповідно до наступної таблиці:

| S/Co | Інтерпретація |
|-----------|---------------|
| < 0.9 | Негативний |
| 0.9 – 1.1 | Двозначний |
| > 1.1 | Позитивний |

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не був інфікований HEV або що одиницю крові можна переливати.

Будь-якого пацієнта, який показує **неоднозначний** результат, слід повторно перевірити на другому зразку, взятому через 1-2 тижні від пацієнта, та перевірити зразок. Не слід переливати одиницю крові.

Позитивний результат свідчить про HEV-інфекцію, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином, або одиницю крові слід викинути.

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений альтернативним методом, здатним виявити антитіла до HEV за іншою технологією.
- Порівнюючи результати аналізу з будь-яким іншим комерційним продуктом з маркуванням CE/FDA, слід нагадати, що набір DiaPro виявляє всі антитіла, включаючи IgM та IgA, а не тільки IgG.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз HEV повинен поставлений і переданий пацієнту лікарем з відповідною кваліфікацією.
- У випадку, якщо набір використовується зі зразками тваринного походження, керівник лабораторії несе відповідальність за призначення відповідного значення Cut-off, а потім обчислення результату.

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як крок читання, описаний у розділі М, пункт 10):

Наведені нижче дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Негативний контроль: 0.049 – 0.050 – 0.051 OD450 nm (nm)
Середнє значення: 0.500 OD450 nm (nm)
Нижче 0.150 – Приймається

Позитивний контроль: 2.589 – 2.591 OD450 nm (nm)
Середнє значення: 2.590 OD450 nm (nm)
Більше 1.000 – Приймається

Cut-off = 0.050 + 0.250 = 0.300
Калібратор: 0.930 – 0.936 OD450 nm (nm)
Середнє значення: 0.933 OD450 nm (nm) S/Co = 3.1
S/Co вище 1.5 – Приймається

Зразок 1: 0.070 OD450 nm (nm)
Зразок 2: 1.690 OD450 nm (nm)
Зразок 1 S/Co < 0.9 = негативний
Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. МЕЖА ВИЯВЛЕННЯ

Її оцінили за допомогою референтного реагенту 1-го ВООЗ на антитіла до HEV, код NIBSC 95/584. Препарат розбавляли в об'єднаній сироватці людини, негативній на HEV антитіла, і потім тестували трьома партіями. Результати представлені в таблиці нижче:

| МО/мл (IU/ml) | P 1 Середнє OD450 | P 2 Середнє OD450 | P 3 Середнє OD450 | Середнє OD450 | Середнє STD |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|-------------|
| 2.0 | 2.442 | 2.456 | 2.452 | 2.450 | 0.088 |
| 1.0 | 1.305 | 1.301 | 1.297 | 1.301 | 0.111 |
| 0.5 | 0.587 | 0.600 | 0.603 | 0.597 | 0.019 |
| 0.25 | 0.269 | 0.273 | 0.272 | 0.272 | 0.029 |

| | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0.125 | 0.131 | 0.129 | 0.127 | 0.129 | 0.007 |
| 0.062 | 0.068 | 0.070 | 0.065 | 0.068 | 0.008 |
| 0.031 | 0.036 | 0.034 | 0.034 | 0.035 | 0.005 |
| 0 | 0.009 | 0.008 | 0.004 | 0.007 | 0.006 |

Межа виявлення, розрахована як середнє значення OD450 нм (nm) Негативного Контролю (0 МО/мл (IU/ml)) + 5xSTD, виявилася набагато кращою, ніж **0.25 МО/мл (IU/ml) ВООЗ**.

2. ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Дослідження проводили з урахуванням граничного значення 0.25 МО/мл (IU/ml) ВООЗ.

2.1 Діагностична Чутливість

Було розраховано на панелі позитивних зразків, що попередньо пройшли скринінг з комерційним продуктом із маркуванням CE для визначення анти-HEV Ab (але переважно IgG, як повідомляється в їх IFU) та на двох комерційно доступних сероконверсіях.

Результати наведені в таблиці нижче для цих двох панелей (Biomex – Німеччина).

| | HEV Ab VersionULTRA | | РЕФЕРЕНСНИЙ НАБІР | |
|-------------------|------------------------|----------------|----------------------|-------------|
| | середнє OD450 | S/CO | середнє OD450 | S/CO |
| SCP-HEV-006b № 1 | 0.015 | 0.1 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 2 | 0.010 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 3 | 0.011 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 4 | 0.016 | 0.1 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 5 | 0.015 | 0.1 | 0.001 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 6 | 0.009 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 7 | 0.010 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-006b № 8 | 0.592 | 2.3 | 0.013 | 0.1 |
| SCP-HEV-006b № 9 | 2.859 | 11.1 | 1.868 | 9.8 |
| SCP-HEV-006b № 10 | 1.755 | 6.8 | 1.972 | 10.4 |
| SCP-HEV-006b № 11 | 3.526 | 13.7 | 2.866 | 15.1 |
| SCP-HEV-006b № 12 | 3.625 | 14.1 | 2.459 | 12.9 |
| SCP-HEV-006b № 13 | 3.712 | 14.4 | 2.959 | 15.6 |
| SCP-HEV-006b № 14 | 3.703 | 14.4 | 2.857 | 15.0 |
| SCP-HEV-006b № 15 | 3.609 | 14.0 | 3.130 | 16.5 |
| SCP-HEV-006b № 16 | 3.749 | 14.5 | 3.068 | 16.1 |
| SCP-HEV-006b № 17 | 3.700 | 14.3 | 3.160 | 16.6 |
| SCP-HEV-006b № 18 | 3.650 | 14.1 | 3.096 | 16.3 |
| SCP-HEV-006b № 19 | 3.695 | 14.3 | 2.776 | 14.6 |
| SCP-HEV-006b № 20 | over | > 19 | 3.032 | 16.0 |
| SCP-HEV-006b № 21 | over | > 19 | 3.170 | 16.7 |
| SCP-HEV-006b № 22 | 3.852 | 14.9 | 3.224 | 17.0 |
| SCP-HEV-006b № 23 | over | > 19 | 3.280 | 17.3 |

| | HEV Ab VersionULTRA | | РЕФЕРЕНСНИЙ НАБІР | |
|------------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | середнє OD450 | S/CO | середнє OD450 | S/CO |
| SCP-HEV-001b № 1 | 0.008 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-001b № 2 | 0.006 | 0.0 | 0.000 | 0.0 |
| SCP-HEV-001b № 3 | 1.049 | 4.1 | 0.007 | 0.0 |
| SCP-HEV-001b № 4 | 3.487 | 13.5 | 0.918 | 4.8 |
| SCP-HEV-001b № 5 | 3.236 | 12.5 | 2.160 | 11.4 |
| SCP-HEV-001b № 6 | 2.377 | 9.2 | 3.074 | 16.2 |
| SCP-HEV-001b № 7 | 2.113 | 8.2 | 3.310 | 17.4 |
| SCP-HEV-001b № 8 | 3.577 | 13.9 | 3.875 | 20.4 |

Зразки SCP-HEV-006b № 8 і SCP-HEV-001b № 3 виявилися позитивними на анти-HEV IgM з продуктом, код DiaPro EVM.CE.
Загальне значення Діагностичної Чутливості було 100%.

2.2 Діагностична Специфічність

Була розрахована на панелі негативних зразків, що попередньо пройшли скринінг з комерційним продуктом із маркуванням CE для визначення анти-HEV Ab (але переважно IgG, як повідомляється в їх IFU) та на панелі потенційних інтерферентів.
У таких зразках не було виявлено жодних інтерференцій, а загальне значення Діагностичної Специфічності було > 99.5.
Отримані 0.5% хибнопозитивних зразків виявилися переважно IgM та/або IgA позитивними.

3. ТОЧНІСТЬ

Було розраховано для двох зразків, одного негативного та одного низькопозитивного, досліджених у 16 повторях у трьох окремих сесіях. Знайдено значення CV в межах 5-10%, залежно від значень OD450 нм (nm). Отримана мінливість не призвела до неправильної класифікації зразків.

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі читання, описаному в розділі M, пункт 10.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Помічено, що заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину після розморожування, дають деякі помилкові результати.

ЛІТЕРАТУРА

1. Tian-Cheng Li et al., Journal of Virology, 1997, p 7207-7213.
2. Michaela A. Riddell et al., Journal of Virology, 2000, p 8011-8017.
3. J.M.Echevarria et al., J. Med. Virol., 85, 2013, p 1037-1045.
4. M.Fogeda et al., 2012, 84, p 71-74.
5. Saskia A. et al., EID Journal, 2009, 15/3.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК

DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО

Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (МІ) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

