

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ІgG ДО ЦИТОМЕГАЛОВІРУСУ

Кат. №: **LUA-CMVG.CE**
Кількість тестів: **96**

Дата випуску інструкції: **11-2019**
Версія: **5**

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл ІgG до Цитомегаловірусу у плазмі та сироватці

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл ІgG до Цитомегаловірусу у плазмі та сироватці. Тільки для діагностики «in vitro».

В. ВСТУП

Цитомегаловірус або ЦМВ є розповсюдженим збудником хвороби людини, інфікування яким особливо поширене серед дітей та молодих людей. Інфекції, спричинені ЦМВ, продовжують залишатися важливою проблемою здоров'я у деяких популяціях пацієнтів, таких як новонароджені, реципієнти солідних органів або кісткового мозку та хворі на СНІД. У цих групах ЦМВ є основною причиною захворюваності та смертності.

Виявлення специфічних до вірусу антитіл ІgG та ІgM має велике значення для діагностики гострих/первинних вірусних або реактивації латентної інфекції, за відсутності типових клінічних симптомів.

Безсимптомні інфекції, спричинені ЦМВ, зазвичай трапляються у явно здорових людей, під час вагітності та при деяких захворюваннях як ко-інфекції.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті нативними антигенами Цитомегаловірусу, високо очищені шляхом центрифугування з градієнтом сахарози та інактивовані.

Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, і ІgG до Цитомегаловірусу захоплюється антигенами, якщо він є.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка у 2-й інкубації зв'язані ІgG до Цитомегаловірусу, виявляються шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл до ІgG, мічених пероксидазою (HRP).

Фермент, захоплений на твердій фазі, діє на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл ІgG до Цитомегаловірусу, присутніх у зразку. Калібрувальна крива, відкалібрована відповідно до Першого міжнародного стандарту ВООЗ, дає можливість кількісного визначення антитіл ІgG у пацієнта.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет: **MICROPLATE**

12 смужок х 8 мікролунок, покритих високоочищеним та інактивованим УФ Цитомегаловірусом у присутності бічачих білків. Планшети запечатані в пакет з осушувачем. Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриттям; повторно закрити невикористані стрипи в пакеті з осушувачем і зберігати при температурі 2..8 °C (°C).

2. Калібратори: **CAL N° ..**

Готова до використання та кодована кольором стандартна крива, отримана з позитивної на ІgG до ЦМВ плазми людини та титрована за стандартом ВООЗ (запропонований міжнародний стандарт) у діапазоні:

4 мл (ml) CAL 1 = 0 ВООЗ МО/мл (IU/ml)
4 мл (ml) CAL 2 = 0.5 ВООЗ МО/мл (IU/ml)
2 мл (ml) CAL 3 = 1 ВООЗ МО/мл (IU/ml)
2 мл (ml) CAL 4 = 2 ВООЗ МО/мл (IU/ml)
2 мл (ml) CAL 5 = 4 ВООЗ МО/мл (IU/ml)
4 мл (ml) CAL 6 = 8 ВООЗ МО/мл (IU/ml).

Стандарти калібруються відповідно до запропонованого міжнародного стандарту ВООЗ для ІgG до ЦМВ (документ BS/95.1814). Він містить білки сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Трис-цитратний буфер рН 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% Na-

азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти мають синій колір.

3. Контрольна сироватка: **CONTROL ...ml**

1 флакон. Ліофілізований. Містить протеїни сироватки великої рогатої худоби, антитіла ІgG людини до ЦМВ, калібровані за 2 ВООЗ МО/мл (IU/ml) +10%, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

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

4. Буферний концентрат для промивання: **WASHBUF 20X**

1x60 мл (ml)/пляшку. 20-кратний концентрований розчин.

Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера рН 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

5. Ферментний кон'югат: **CONJ**

2x8 мл (ml)/флакон. Готовий до використання та кодується червоним кольором. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому поліклональні антитіла до людського ІgG, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис-буфера рН 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300, 0.02% сульфату гентаміцину як консерванти та 0.01% червоного харчового барвника.

6. Хромоген/Субстрат: **SUBS TMB**

1x16 мл (ml)/флакон. Містить 50 мМ (mM) розчину цитратно-фосфатного буфера рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетра-метил-бензидину (TMB), 0.02% перекису водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливий до сильного освітлення.

7. Сірчана кислота: **H₂SO₄ 0.3 M**

1x15 мл (ml)/пляшку. Містить 0.3 М (M) розчину H₂SO₄.

Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

8. Розчинник для зразків:

2 x 60 мл (ml)/флакон. Він містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) трис-цитратного буфера рН 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Реагент має маркування синього кольору.

9. Покривна фольга для планшета х 2 шт.

10. Вкладиш інструкції х 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Відкалібровані мікродозатори (1000 мкл (μl), 100 мкл (μl) і 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу ІФА (бідистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- 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 процедурі роботи з інфекційно небезпечними речовинами.
- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.

4. 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. Не піддавайте Хромоген/Субстрат (ТМВ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стелю, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведені на відкритому наборі, не показало будь-яку втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворилися 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 автоклавуванням при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. 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.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. 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.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка збираються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Ніякого впливу при приготуванні зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. 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 виб'яте 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.

5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.
6. Зразки з очікуваною концентрацією антитіл IgG до ЦМВ вищою за 8 МО/мл (IU/ml) перед використанням слід розбавити або 1:10, або 1:100 з використанням калібровача 0 МО/мл (IU/ml). Розведення слід проводити в чистих одноразових пробірках, розбавляючи 50 мкл (µl) кожного зразка 450 мкл (µl) Cal 0 (1:10). Потім 50 мкл (µl) розведення 1:10 розбавляють з 450 мкл (µl) Cal 0 (1:100). Ретельно перемішайте пробірки на вортексі, а потім перейдіть до етапу розведення, описаного в розділі М.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведені на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 3 місяців.

Мікропланшети:

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 LABUA. Невикористані стрипи потрібно покласти назад в алюмінієвий пакет, разом з осушувачем, щільно закрити і зберігати при +2-8 °C (°C). При першому відкритті смужки, що залишились, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не перетвориться з жовтого на зелений.

Калібровачі:

Готові до використання. Перед використанням ретельно перемішати на вортексі.

Контрольна сироватка:

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

Примітка: Контроль після розчинення не є стабільним. Зберігати замороженими в аліквотах при -20 °C (°C).

Концентрат Промивного буфера:

Весь вміст концентрованого розчину потрібно 20-кратно розбавити бідистильованою водою і обережно перемішати з денця на кришку перед використанням. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів 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.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами.

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові, 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.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Сірчана кислота:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Увага: Подразнююча 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**:

R280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

R302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

R332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

R337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

R362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

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

1. Мікродозатори повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також повинні проводитися регулярно незараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
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.
3. **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 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 (µl)/лунку 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 хибнопозитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск ± 5%.
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 (а) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) 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.
6. 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 О «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 подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується, коли кількість зразків, що тестуються, перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені видимими частинками або скупченнями.
3. Переконайтесь, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтесь, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтесь, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розчиніть вміст ліофілізованої Контрольної сироватки, як описано у відповідному розділі.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте обережно на вортексі усі рідкі реагенти.
8. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивання, як повідомляється в конкретному розділі.
9. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
10. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтесь, що мікродозатори встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. 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.

Набір може бути використаний як для кількісного так і для якісного визначення.

M1. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ:

Автоматизований аналіз:

Якщо тест проводиться автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо аспірувати у прилад 1000 мкл (µl) розчинника зразків, а потім 10 мкл (µl) зразка (коефіцієнт розведення 1:101).

Потім весь вміст додається у відповідно визначену пробірку для розведення. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного зараження зразків. Коли всі зразки будуть розведені, за допомогою приладу додайте 100 мкл (µl) зразків у відповідні лунки мікропланшета.

Цю процедуру також можна проводити у два етапи розведення по 1:10 кожен (90 мкл (µl) розчинника зразка + 10 мкл (µl) зразка) у другу платформу для розведення. Потім проведіть аспірацію приладом, спочатку 100 мкл (µl) розчинника для зразків, потім 10 мкл (µl) рідини з першого розведення у платформі і, нарешті, додайте весь вміст у відповідну лунку аналізу мікропланшета.

Не розбавляйте Калібратори та розчинену Контрольну Сироватку, тому що вони готові до використання.

Додайте 100 мкл (µl) калібраторів/контролю у відповідні лунки калібраторів/контролів.

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

Настійно рекомендується перевірити, чи проміжок часу між видачею першого та останнього зразка буде розрахований приладом та врахований, відповідно відклавши першу операцію промивання.

Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101 у відповідній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) розчинника для зразків + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте набір Калібраторів, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач. Залишіть A1 і B1 порожніми для бланкування.

- Внесіть 100 мкл (μl) Калібраторів та 100 мкл (μl) Контрольної сироватки в дублях. Потім розлийте по 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну визначену лунку.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хв при +37 °C (°C)**.

Важлива примітка:

Стрипи слід герметизувати за допомогою клейкої покривної фольги, що входить до набору, лише коли тестування проводяться вручну. Не закривайте смужки під час використання автоматичних приладів ІФА.

- Промийте мікропланшет за допомогою автоматичного вошера шляхом подачі та аспірації, як було зазначено раніше (розділ І.3).
- Піпетуйте 100 мкл (μl) ферментного кон'югату в кожну лунку, за винятком лунок А1+В1 для бланкування, і накрийте герметичною плівкою. Переконайтеся, що цей компонент червоного кольору доданий у всі лунки, крім А1 та В1.

Важлива примітка:

Будьте обережні, щоб не торкнутися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, заповненим ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубувати мікропланшет протягом **60 хв при +37 °C (°C)**.
- Промити мікролунки як на етапі 5.
- Піпетувати 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунки А1 + В1. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важлива примітка: Не піддавати впливу сильного прямого світла. Може утворитися високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на кроці 9. Додавання кислоти перетворить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, на 450 нм (nm) фільтрі (зчитування) та на 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи прилад на А1 або В1, або на обох.

М2. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо потрібно якісне визначення, дійте, як описано нижче:

Автоматизований аналіз:

Дійте, як описано в розділі М1.

Ручний аналіз:

- Розведіть зразки 1:101 у відповідній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (μl) розчинника для зразків + 10 мкл (μl) зразка). Не розбавляйте набір Калібраторів, оскільки вони готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач. Залишіть А1 порожньою для бланкування.
- Внесіть 100 мкл (μl) Калібратора 0 МО/мл (IU/ml) та 100 мкл (μl) Калібратора 0.5 МО/мл (IU/ml) в дублях, 100 мкл (μl) Калібратора 8 МО/мл (IU/ml) одноразово. Потім додайте 100 мкл (μl) розведених зразків у кожну відповідну лунку.
- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хв при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки слід герметизувати клейкою покривною фольгою, що постачається, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, подавши та аспіруючи як зазначено у розділі І.3.
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату у кожну лунку, крім лунок А1 для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що цей червоний компонент розподілений у всі лунки, крім А1.

Важливі примітки: Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунки наконечником піпетки, коли дозується кон'югат. Може статися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °C (°C)**.
- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як у кроці 8.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет протягом **20 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може створюватися високий фон.

- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 9, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивних калібраторів та контрольної сироватки та позитивних зразків з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1.

Важливі 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.
- Контрольна сироватка (CS) не впливає на розрахунок результатів тесту. Контрольну сироватку можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Калібратори та Контроль	100 мкл (μl)
Зразки, розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Приклад схеми дозування для кількісного аналізу наведено нижче:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1										
B	BLK	CAL4	S2										
C	CAL1	CAL5	S3										
D	CAL1	CAL5	S4										
E	CAL2	CAL6	S5										
F	CAL2	CAL6	S6										
G	CAL3	CS	S7										
H	CAL3	CS	S8										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор CS = Контрольна сироватка S = Зразок

Приклад схеми дозування для якісного аналізу наведено нижче:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11										
B	CAL1	S4	S12										
C	CAL1	S5	S13										
D	CAL2	S6	S14										
E	CAL2	S7	S15										
F	CAL6	S8	S16										
G	S1	S9	S17										
H	S2	S10	S18										

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях та калібраторі щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результативність аналізу є такою, якою очікується та вимагається Директивою IVDD 98/79/ЄС. Контролюйте відповідність наступних даних.

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ при 450 нм (nm)
Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (CAL)	< 0.150 Середнього значення ОЩ при 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml)	ОЩ при 450 нм (nm) > ОЩ при 450 нм (nm) CAL1 + 0.100
Калібратор 8 МО/мл (IU/ml)	ОЩ при 450 нм (nm) > 1.000
Контрольна сироватка	2 ВООЗ МО/мл (IU/ml) +/- 10%

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

В іншому випадку, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ при 450 нм (nm)	що не відбулось забруднення розчину хромогену/субстрату під час аналізу
Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (NC) > 0.150 ОЩ при 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації > 30%	1. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у передкваліфікаційній підготовці; 2. що був використаний належний миючий розчин і перед використанням вошер був ним праймований; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (видача позитивного калібратора замість негативного контролю); 4. що не відбулось жодного забруднення негативного контролю або лунок, де проводився контроль, через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікродозатори не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забиті.
Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml) ОЩ при 450 нм (nm) < ОЩ при 450 нм (nm) CAL1 + 0.100	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час додавання калібратора не сталося помилки, наприклад: додали неправильний калібратор; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулось зовнішнього забруднення калібратора.
Калібратор 8 МО/мл (IU/ml) < 1.000 ОЩ при 450 нм (nm)	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час додавання калібратора не сталося помилки, наприклад: додали неправильний калібратор; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулось зовнішнього забруднення позитивного контролю.
Контрольна сироватка Відрізняється від очікуваних значень	Спочатку перевірити що: 1. процедуру було проведено правильно; 2. не було допущено жодної помилки під час додавання (напр. додали неправильний зразок) 3. процедура промивання та налаштування вошера правильні; 4. що не відбулось зовнішнього забруднення стандарту; 5. контрольна сироватка була розчинена з використанням

	відповідного об'єму, зазначеним на етикетці. Якщо було повідомлено про помилку, аналіз слід повторити після усунення причини цієї помилки. Якщо помилки не виявлено, виконайте наведені нижче дії: а) отримано значення до +/- 20%, загальна точність лабораторії може не дозволити тесту відповідати очікуваному значенню +/- 10%. Повідомте про проблему керівнику для прийняття або відмови від цього результату. б) отримано значення, що перевищує +/- 20%: у цьому випадку тест є недійсним, і необхідно звернутися до служби підтримки LABUA.
--	--

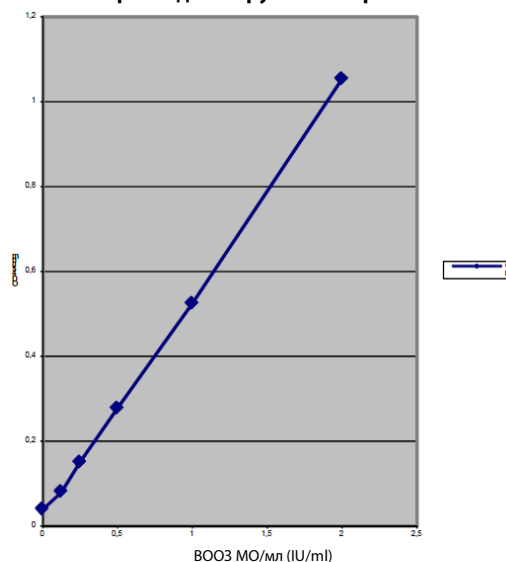
Якщо сталася одна з цих проблем, після перевірки повідомте керівнику про подальші дії.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р.1 Кількісний метод

Якщо тестування виявилось дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму підбору кривих, щоб побудувати калібрувальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами). Потім на калібрувальній кривій обчислюють концентрацію IgG антитіла до Цитомегаловірусу у зразках. Приклад кривої калібрування наведено нижче.

Приклад калібрувальної кривої:



Важлива примітка:

Не використовуйте вищевказану калібрувальну криву для розрахунків.

Р.2 Якісний метод

У якісному методі обчисліть середні значення ОЩ при 450 нм (nm) для калібраторів 0 та 0.5 МО/мл (IU/ml), а потім перевірте, чи правильний аналіз.

Приклад обчислення:

Наступні дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Калібратор: 0 МО/мл (IU/ml):	0.035 - 0.045 ОЩ при 450 нм (nm)
Середнє значення:	0.040 ОЩ при 450 нм (nm)
Нижче ніж 0.150 - Прийнято	
Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml):	0.260 - 0.280 ОЩ при 450 нм (nm)
Середнє значення:	0.270 ОЩ при 450 нм (nm)
Вище ніж Cal 0 + 0.100 - Прийнято	
Калібратор 8 МО/мл (IU/ml):	2.885 ОЩ при 450 нм (nm)
Вище ніж 1.000 - Прийнято	

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Зразки з концентрацією нижче 0.5 ВООЗ МО/мл (IU/ml) вважаються негативними щодо наявності антитіл IgG до Цитомегаловірусу. Зразки з концентрацією вище 0.5 ВООЗ МО/мл (IU/ml) вважаються позитивними щодо наявності антитіл IgG до Цитомегаловірусу. Особливу увагу при інтерпретації результатів слід приділяти подальшому спостереженню за вагітністю у випадку інфікування Цитомегаловірусом через ризик важких вад розвитку новонароджених.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом завідуючого лабораторією, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати тесту передаються з лабораторії до інформаційного центру, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. При спостереженні вагітності позитивний результат (наявність антитіл класу IgG > 0.5 МО/мл (IU/ml) повинен бути підтверджений, щоб виключити ризик хибнопозитивного результату та хибного визначення рівня захисту.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка показників була проведена відповідно до європейського стандарту.

1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу (або аналітичної чутливості) була розрахована за допомогою 1-го запропонованого міжнародного стандарту, розробленого Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) для ЦМВ-IgG.

Межа виявлення розрахована як середнє значення калібратора ОЩ при 450 нм (nm) 0 ВООЗ МО/мл (IU/ml) + 5 СВ.

У таблиці нижче наведені середні значення ОЩ при 450 нм (nm) цього стандарту при розведенні в негативній плазмі, а потім при дослідженні в аналізі.

Середнє значення ОЩ при 450 нм (nm)

ВООЗ МО/мл (IU/ml)	LUA-CMVG.CE Лот 0303	LUA-CMVG.CE Лот 0203	LUA-CMVG.CE Лот 0103
2	1.053	1.101	1.098
1	0.524	0.498	0.559
0.5	0.277	0.268	0.271
0.25	0.150	0.169	0.161
0.125	0.080	0.091	0.087
негативний	0.039	0.035	0.040

Аналіз показує межу виявлення набагато кращу, ніж 0.5 ВООЗ МО/мл (IU/ml); однак інтерпретація результатів зберігається на такому рівні, щоб безпечно контролювати вагітність та ризик у новонароджених.

2. Діагностична чутливість:

Діагностична чутливість була перевірена у зовнішньому дослідженні оцінки ефективності на панелях зразків, класифікованих як позитивні за набором, схваленим FDA. Тестували позитивні зразки від пацієнтів з різними стадіями ЦМВ-інфекції. Значення, отримане в результаті аналізу більш ніж 300 зразків, склало > 98%.

Крім того, було протестовано панель сероконверсії PT 901 виробництва Boston Biomedical Inc., BBI, США. Нижче наведені результати з посиланням на європейський набір.

ВВІ Панель РТС 901

Член ID	LUA-CMVG.CE		BioMerieux VIDAS
	ОЩ при 450 нм (nm)	S/Co	
01	0.071	0.2	Негативний
02	0.043	0.1	Негативний
03	0.057	0.2	Негативний
04	0.046	0.1	Негативний
05	0.086	0.3	Негативний
06	1.002	3.2	Позитивний
07	1.442	4.6	Позитивний
08	1.630	5.2	Позитивний
09	1.770	5.6	Позитивний

Примітка: cut-off = 0.5 МО/мл (IU/ml) = 0.316

3. Діагностична специфічність:

Діагностична специфічність була визначена в тому ж центрі на панелях негативних зразків від неінфікованих осіб, класифікованих як негативні за набором, схваленим FDA США.

Для визначення значення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватку.

Заморожені зразки також були протестовані для перевірки наявності інтерференцій через збір та зберігання.

Інтерференцій не спостерігалось.

Тестувались потенційно інтерферуючі зразки, отримані від пацієнтів з різними патологіями (переважно ANA, AMA та RF позитивні) та від вагітних жінок.

Перехресної реакції не спостерігалось.

Загальне значення > 98% специфічності було виявлено при дослідженні більш ніж 100 зразків.

4. Точність:

Обчислювали на трьох зразках, негативному, низькопозитивному та позитивному, перевірених у 16 повторях у трьох окремих пробігах за трьома лотами. Результати повідомляються таким чином:

LUA-CMVG.CE: лот 0303

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.073	0.073	0.077	0.074
Стандартне Відхилення	0.010	0.010	0.009	0.010
КВ%	13.3	14	12	13.1

Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.316	0.292	0.309	0.306
Стандартне Відхилення	0.027	0.015	0.020	0.020
КВ%	8.4	5.1	6.3	6.6

Калібратор 8 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	3.262	3.137	3.210	3.203
Стандартне Відхилення	0.126	0.065	0.147	0.113
КВ%	3.9	2.1	4.6	3.5

LUA-CMVG.CE: лот 0203

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.058	0.060	0.063	0.061
Стандартне Відхилення	0.005	0.005	0.005	0.005
КВ%	8.8	7.9	8.6	8.4

Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.299	0.297	0.300	0.299
Стандартне Відхилення	0.012	0.007	0.011	0.010
КВ%	3.9	2.5	3.6	3.3

Калібратор 8 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	3.124	3.062	3.094	3.093
Стандартне Відхилення	0.051	0.068	0.057	0.059
КВ%	1.6	2.2	1.9	1.9

LUA-CMVG.CE: лот 0103

Калібратор 0 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.064	0.062	0.067	0.064
Стандартне Відхилення	0.005	0.005	0.006	0.005
КВ%	7.9	8.3	8.2	8.1

Калібратор 0.5 МО/мл (IU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	0.314	0.300	0.296	0.303
Стандартне Відхилення	0.031	0.019	0.012	0.021
КВ%	10.0	6.5	4.0	6.8

Калібратор 8 МО/мл (IU/ml) (к-сть=16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ при 450 нм (nm)	2.729	2.688	2.700	2.705
Стандартне Відхилення	0.109	0.067	0.109	0.095
КВ%	4.0	2.5	4.0	3.5

Варіабельність, показана в таблицях вище, не призвела до неправильної класифікації вибірки.

5. Достовірність

Достовірність аналізу перевіряли тестами на розведення та відновлення. Будь-який "хук-ефект", недооцінка, що можуть відбутися при великих дозах аналіту, було виключено.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або термічна інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту. Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розморожування, можуть дати деякі хибні результати.

Цей тест підходить тільки для тестування окремих зразків, а не пулів.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на основі єдиного результату тесту. Слід враховувати історію хвороби пацієнта, симптоматику та інші діагностичні дані.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.



ВИРОБНИК:

ТОВ «ЛАБЮЕЙ»

Україна, 76018

м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25

Моб.: +38 (067) 000-20-22

E-mail: info@labua.com.ua



UA.TR.116