

АНТИТИЛА ДО НВС

Кат. №: **LUA-EIA.BCAB.96**

Дата випуску інструкції: **11-2019**

Кількість тестів: **96**

Версія: **3**

Конкурентний імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл до ядерного антигену Гепатиту В у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл до ядерного антигену Гепатиту В у сироватці та плазмі людини за системою «конкуренція».

Набір призначений для скринінгу одиниць крові та спостереження за пацієнтами, інфікованими ВГВ.

Тільки для діагностики «in vitro».

B. ВСТУП

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає гепатит В таким чином:

«Гепатит В - одне з найважливіших захворювань людства і є серйозною глобальною проблемою громадського здоров'я. Гепатит означає запалення печінки, і найчастішою причиною є зараження одним із 5 вірусів, які називаються гепатитами А, В, С, D і Е. Усі ці віруси можуть викликати гостре захворювання з симптомами, що тривають кілька тижнів, включаючи пожовтіння шкіри та очей (жовтяниця); темна сеча; сильна втома; нудота; блювота і біль у животі. Щоб знову відчути себе у формі, може знадобитися від кількох місяців до року. Вірус гепатиту В може викликати хронічну інфекцію, при якій пацієнт ніколи не позбавляється від вірусу, а через багато років розвивається цироз печінки або рак печінки.

ВГВ є найсерйознішим типом вірусного гепатиту і єдиним типом, що викликає хронічний гепатит, від якого існує вакцина. Вірус гепатиту В передається при контакті з кров'ю або рідинами тіла інфікованої людини так само, як і вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус, що викликає СНІД. Однак, ВГВ у 50-100 разів більш інфекційний, ніж ВІЛ. Основними шляхами зараження ВГВ є: (а) перинатальний (від матері до дитини при народженні); (б) передача від дитини до дитини; (с) небезпечні ін'єкції та переливання; г) статевий контакт.

У всьому світі більшість інфекцій передається від інфікованої матері до дитини, від контакту дитини з дитиною в побутових умовах та від повторного використання нестерилізованих голівок та шприців. У багатьох країнах, що розвиваються, майже всі діти заражаються вірусом. У багатьох промислово розвинених країнах (наприклад, у Західній Європі та Північній Америці) характер передачі інший. У цих країнах передача від матері до дитини та від дитини до дитини становила до однієї третини хронічних інфекцій до впровадження програм вакцинації проти дитячого гепатиту В. Однак, більшість інфекцій у цих країнах передається в молодому віці шляхом статевої активності та вживання ін'єкційних наркотиків. Крім того, вірус гепатиту В є основною інфекційною небезпечкою для медичних працівників, і більшість медичних працівників отримали вакцину проти гепатиту В.

Вірус гепатиту В не поширюється через заражену їжу або воду, і його неможливо поширити випадково на робочому місці. Високі показники хронічної інфекції ВГВ спостерігаються також у південних районах Східної та Центральної Європи. На Близькому Сході та в Індійському субконтиненті близько 5% хронічно інфіковані. Інфекція рідше зустрічається в Західній Європі та Північній Америці, де менше 1% хронічно інфіковані.

Маленькі діти, інфіковані ВГВ, мають найбільшу ймовірність розвитку хронічної інфекції. Приблизно у 90% немовлят, інфікованих протягом першого року життя, і від 30% до 50% дітей, інфікованих у віці від 1 до 4 років, розвивається хронічна інфекція. Ризик смерті від раку печінки або цирозу печінки, пов'язаного з ВГВ, становить приблизно 25% для осіб, які хронічно інфіковані в дитинстві.

Хронічний гепатит В у деяких пацієнтів лікується препаратами під назвою *інтерферон* або *ламівудин*. Пацієнтам з цирозом печінки іноді роблять трансплантацію печінки, але бувають різні наслідки. Краще попередити цю хворобу вакциною, ніж намагатися їївилікувати.

Вакцина проти гепатиту В має видатні показники безпеки та ефективності. З 1982 року у всьому світі було використано понад один мільярд доз вакцини проти гепатиту В. Вакцина вводиться у вигляді серії з трьох внутрішньом'язових доз. Дослідження показали, що вакцина на

95% ефективна для запобігання розвитку хронічної інфекції у дітей та дорослих, якщо вони ще не заражені. У багатьох країнах, де від 8% до 15% дітей раніше хронічно інфікувалися ВГВ, рівень хронічної інфекції знизився до менш, ніж 1% в імунізованих групах дітей. З 1991 року ВООЗ закликає всі країни додати вакцину проти гепатиту В у свої національні програми імунізації.»

Ядерний антиген гепатиту В (або НВсAg) є основним компонентом основних частинок ВГВ. НВсAg складається з одного поліпептиду приблизно 17 кД (кД), який виділяється при дезагрегації частинок ядра; антиген містить щонайменше одну імунологічну детермінанту.

Після первинної інфекції антитіла до НВсAg є одним з перших маркерів гепатиту ВГВ, що з'являється у сироватці крові пацієнта, дещо пізніше, ніж НВсAg, поверхневий антиген вірусу. Антитіла до НВсAg виробляються зазвичай при високих титрах, і їх наявність можна виявити навіть через роки після зараження. Ізольований НВсAb, за відсутності інших маркерів ВГВ, спостерігався в одиницях інфікованої крові, що свідчить про використання цього тесту для скринінгу ВГВ, на додаток до НВсAg. Визначення НВсAb стало важливим для класифікації вірусного агента разом із виявленням інших маркерів інфекції ВГВ у сироватці та плазмі.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз ґрунтується на принципі «конкуренції», коли антитіла у зразку конкурують з моноклональним антитілом за фіксовану кількість антигену на твердій фазі.

Очищений рекомбінантний НВсAg нанесений на мікролунки. Сироватку/плазму пацієнта додають у мікролунку разом з добавкою, здатною блокувати перешкоди, присутні у зразку.

У другій інкубації після промивання додають моноклональне антитіло, кон'юговане з пероксидазою хрому (HRP) і специфічне для НВсAg, і воно зв'язується з вільним гес-НВсAg, покритим пластиком.

Після інкубації мікролунки промивають, щоб видалити будь-який незв'язаний кон'югат, а потім додають хромоген/субстрат. У присутності ферменту пероксидази, безбарвний субстрат гідролізується до забарвленого кінцевого продукту.

Інтенсивність забарвлення обернено пропорційна кількості антитіл до НВсAg, присутніх у зразку.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет **MICROPLATE**

12 смужок по 8 мікролунок, покритих рекомбінантним НВсAg і запакованих в пакет із осушувачем. Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриттям; повторно закрити невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігати при температурі 2..8 °C (°C).

2. Негативний контроль **CONTROL -**

1x1.0 мл/флакон. Готовий до використання. Містить 5% бичачого сироваткового альбуміну, 10 мМ (mM) фосфатного буферу рН 7.4 +/- 0.1, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Негативний контроль блідо-жовтого кольору.

3. Позитивний контроль **CONTROL +**

1x1.0 мл (ml)/флакон. Готовий до використання. Містить 5% бичачого сироваткового альбуміну, антитіла до НВсAg при концентрації близько 10 PEI О/мл (U/ml) (калібровано за довідковим матеріалом PEI НВс 82), 10 мМ (mM) фосфатного буферу рН 7.4 +/- 0.1, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Позитивний контроль має зелене забарвлення.

4. Калібратор **CAL ...**

x1 флакон, ліофілізований. Розчиняється у воді класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить бичачу сироватку плоду, антитіла людини до НВсAg у концентрації 2 PEI О/мл (U/ml) +/- 10% (калібровано за довідковим матеріалом PEI НВс 82) та 0.045% ProClin 300 в якості консерванту.

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

5. Концентрат буферу для промивання **WASHBUF 20X**

1x60 мл (ml)/пляшку. 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу рН 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 і 0.045% ProClin 300.

6. Ферментний кон'югат **CONJ**

1x16 мл (мл)/флакон. Розчин готовий до використання. Містить 5% бичачого сироваткового альбуміну, 10 мМ (mM) трис-буферу рН 6.8 +/- 0.1, кон'югованого з пероксидазою хрому мишачого моноклонального антитіла до HBsAg у присутності 0.3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 в якості консерванту. Компонент має червоний колір.

7. Хромоген/Субстрат **SUBS TMB**

1x16 мл (мл)/флакон. Містить 50 мМ (mM) буферний розчин цитрат-фосфату при рН 3.6 +/- 0.1, 0.03% тетра-метил-бензидину (TMB), 0,02% перекису водню (H₂O₂) та 4% диметилсульфоксиду.

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

8. Розчинник для зразків **DILSPE**

4x3 мл (мл)/флакон. 10 мМ (mM) трис-буферного розчину рН 8.0 +/- 0.1, що містить 0.045% ProClin 300 для попередньої обробки зразків та контролів в планшеті, блокуючи перешкоди. Компонент позначений синім кольором.

Примітка: Використайте весь вміст одного флакону перед відкриттям другого. Реагент чутливий до окислення.

9. Сірчана кислота **H₂SO₄ 0.3 M**

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

10. Ущільнювальна фольга для планшети x 2 шт.

11. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (100 мкл (μl) і 50 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C).
6. 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.

Ф. 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 (Міністерство охорони здоров'я або аналогічний орган) для проведення такого 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 ознайомлений з процедурами біобезпеки, як це рекомендує Центр 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, безпечно та ефективно.
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. Захищати Хромоген (ТМБ) від впливу сильного світла та уникати вібрації поверхні стенду, де проводиться тестування.
6. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.

7. Не обмінюйте компоненти між різними лотами наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами одного лоту не мінялися місцями.
8. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо 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 рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
16. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
17. 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 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 азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату.
3. 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.
4. 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.
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 вибрані 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 після розморожування присутні частинки (як це часто трапляється зі старими зразками в невеликих об'ємах і в плазмі), центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще,

фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8μ для очищення зразка перед тестуванням.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

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

1. Мікропланшети:

Перед відкриттям контейнера, дозвольте мікропланшету досягнути 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 смужки 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.

2. Негативний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

3. Позитивний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

4. Калібратор:

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

Примітка: Розчинений калібратор не є стабільним. Зберігати замороженим в аликвотах при -20 °C (°C).

5. Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розвести бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця 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).

6. 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.

7. Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

Не піддавати сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

8. Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Обережно перемішайте на вортексі перед використанням. Використайте весь вміст одного флакону перед відкриттям другого. Реагент чутливий до окислення.

9. 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 **H-фрази:**

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-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.

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

- Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярну дезінфекцію (70% етанол, 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 правдивість +/- 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.
- 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 дезінфекцію згідно з його керівництвом (пропонується дезінфекція 0.1 M (M) 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 забиті сіллю голки, 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) пропускну 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 «Валідація тесту» та «Робочі характеристики». 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 через сильно реагуючі зразки, що призводить до хибнопозитивних результатів. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується для скринінгу крові та коли кількість зразків, що підлягають тестуванню, перевищує 20-30 одиниць за один пробіг.
- Служба підтримки клієнтів LABUA 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.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ПЕРЕД ПРОВЕДЕННЯМ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося пошкодження. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть Калібратор як описано вище та обережно перемішайте.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі усі рідкі реагенти.
6. 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.
7. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
8. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
9. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
10. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
11. 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.

1. Помістіть необхідну кількість смужок у пластиковий тримач і ретельно визначте лунки для контролю, калібратора та зразків.
2. Лунку A1 залишіть порожньою для бланкування.
3. Внесіть 50 мкл (μl) Розчинника для зразка у всі лунки з контролем та зразком
4. Піпетуйте 50 мкл (μl) Негативного контролю в трьох примірниках, 50 мкл (μl) калібратора в двох примірниках, а потім 50 мкл (μl) позитивного контролю одноразово. Потім додайте по 50 мкл (μl) кожного зі зразків.
5. Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв. при 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Смужки слід заклеювати клейкою ущільнювальною фольгою, лише коли тестування проводиться вручну. Не закривайте смужки під час використання автоматичних приладів ІФА.

6. Після закінчення першої інкубації, промийте мікролунки, як було описано (розділ I.3).
7. Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного кон'югату у всі лунки, окрім A1; інкубуйте мікропланшет **протягом 60 хв. при 37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Будьте обережні, щоб не торкнутися пластикової внутрішньої поверхні лунки з наконечником, заповненим Ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

8. Після другої інкубації, промийте лунки, як було описано (розділ I.3).
9. Піпетуйте 100 мкл (μl) Хромогену/Субстрату у всі лунки, включаючи A1.

Важливе зауваження: не піддавати прямому сильному впливу світла оскільки може бути створено високий фон.

10. Інкубуйте мікропланшет, захищаючи від світла, **при кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**. Лунки з негативним контролем та негативними зразками перетворюються з прозорих на сині (конкурентний метод).
11. Піпетуйте 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на етапі 9, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання стоп-розчину перетворить негативний контроль та негативні зразки з синього на жовтий.

12. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, використовуючи фільтр 450 нм (зчитування) та фільтр 620-630 нм (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи прилад на A1

Важливі зауваження:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. 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.
3. Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок cut-off значення, а отже, на розрахунок результатів тестування. Калібратор можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Розчинник для зразка	50 мкл (μl)
Контролі, калібратори та зразки	50 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів з 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів з 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/Н ₂ O ₂ суміш	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми видачі:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CAL	S6										
F	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Легенда: BLK = Бланк CAL = Калібратор NC = Негативний Контроль PC = Позитивний Контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожного разу, коли використовується набір, проводиться перевірка контролів/калібратора, щоб перевірити, чи очікувані значення ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) або Co/S узгоджуються в аналізі. Переконайтеся, що виконані наступні параметри:

Перевірка	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 Значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	> 1.000 Середнього значення ОЩ 450 нм після бланкування
Калібратор (приблизно 2 PEI O/мл (U/ml))	Co/S > 1
Позитивний контроль	< 0.200 ОЩ 450 нм (nm)

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, та виконайте наступні перевірки:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка > 0.500 ОЩ 450 нм (nm)	що розчин хромогену/субстрату не забруднився під час аналізу

<p>Негативний контроль (NC) <1.000 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування</p> <p>Коефіцієнт варіації >20%</p>	<p>1. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний належний миючий розчин і перед використанням вошер був ним заправлений; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (видача позитивного контролю замість негативного контролю); 4. що не відбулося жодного забруднення негативного контролю або лунок, у яких роздавали контроль через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забиті.</p>
<p>Калібратор Co/S <1</p>	<p>1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час додавання калібратора не сталося помилки, наприклад: замість калібратора додали негативний контроль; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.</p>
<p>Позитивний контроль >0.200 ОЩ 450 нм (nm)</p>	<p>1. що процедуру було проведено правильно; 2. що не було допущено жодної помилки під час додавання контролю (напр. додали негативний контроль замість позитивного контролю) 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.</p>

Якщо виникла якась із вищезазначених проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

Важливе зауваження:

Аналіз слід виконувати, як і на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 12.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Результати розраховуються за допомогою граничного значення, визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-off} = (\text{NC} + \text{PC})/5$$

Важливе зауваження: Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для обчислення граничного значення cut-off та отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати інтерпретуються як співвідношення між значенням cut-off та зразком ОЩ450нм/620-630нм або S/Co.

Результати інтерпретуються згідно з наступною таблицею.

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

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не заразився ВГВ. Зразок пацієнта, який показав двозначний результат, слід повторно перевірити на другому зразку, який було взято через 1-2 тижні після первинного зразка.

Не слід переливати одиницю крові.

Позитивний результат свідчить про інфекцію ВГВ, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином або слід утилізувати цю одиницю крові.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати тестування передаються з лабораторії в інший заклад, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Відповідний кваліфікований лікар повинен встановити та передати пацієнту діагноз інфекції вірусного гепатиту.

Приклад розрахунку наведено нижче (дані, отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 12):

Замість цього не можна використовувати наведені нижче дані або реальні цифри, отримані користувачем.

Негативний контроль: 2.000 - 2.200 - 2.000 ОЩ 450 нм (nm)

Середнє значення: 2.100 ОЩ 450 нм (nm)

Вище ніж 1.000 - Прийнято

Позитивний контроль: 0.100 ОЩ 450 нм (nm)

Нижче ніж 0.200 - Прийнято

$$\text{Граничне значення (Cut-off)} = (2.100 + 0.100)/5 = 0.440$$

Калібратор: 0.400 - 0.360 ОЩ 450 нм (nm)

Середнє значення: 0.380 ОЩ 450 нм (nm)

Co/S > 1 - Прийнято

Зразок 1: 0.028 ОЩ 450 нм (nm)

Зразок 2: 1.890 ОЩ 450 нм (nm)

Зразок 1 Co/S > 1.1 позитивний

Зразок 2 Co/S < 0.9 негативний

R. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка характеристик була проведена відповідно до того, що повідомляється у Загальних технічних специфікаціях або CTS (стаття 5, глава 3 Директиви IVD 98/79/ЄС).

1. МЕЖА ВИЯВЛЕННЯ

Чутливість аналізу розраховували за допомогою референсного препарату для НВсАб, наданого Інститутом Пола Ерліха (PEI НВс Референсний матеріал 82). Аналіз показує чутливість приблизно 1.25 PEI О/мл (U/ml).

У наведеній нижче таблиці подано значення Co/S, показані стандартом PEI, розведеним відповідно до пропозицій виробника для підготовки кривої обмеження розведення у ембріональній телячій сироватці (FCS).

PEI О/мл (U/ml)	Лот 1001	Лот 0702	Лот 0702/2	Лот 1202
5	22.6	18.0	19.0	17.7
2.5	8.0	5.5	5.4	5.0
1.25	1.1	1.3	1.0	1.0
0.625	0.4	0.4	0.4	0.4

Крім того, Accurin 1 - серія 3000, що постачається компанією Boston Biomedica Inc., США, був протестований для визначення його значення Co/S. Результати наведені в таблиці нижче:

Accurin 1 - серія 3000			
Значення	Лот 1001	Лот 0702	Лот 1202
Co/S	2.9	2.3	2.2

2. ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ І ЧУТЛИВІСТЬ

Оцінка продуктивності пристрою була проведена на тестуванні більше ніж 6000 зразків.

2.1 Діагностична специфічність

Вона визначається як ймовірність аналізу негативного оцінки за відсутності конкретного аналіту. На додаток до першого дослідження, в якому було досліджено в цілому 5179 невідірних донорів, у тому числі донорів першого разу, 206 зразків від госпіталізованих пацієнтів та 164 потенційно інтерферуючі зразки були протестовані, та діагностична специфічність нещодавно була оцінена шляхом тестування в цілому 1498 негативних зразків на семи різних лотах. Спостерігалось значення специфічності 100%. На додаток до вищезазначеної популяції, 189

потенційно інтерферуючих зразків (інші захворювання печінки, вагітні жінки, гемолізовані, ліпемічні, РЧ-позитивні) були протестовані та визнані негативними, підтверджуючи 100% специфічність пристрою. Нарешті, для визначення специфічності була використана як людська плазма, отримана за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки людини. Жодної хибної реакційної здатності через метод приготування зразків не спостерігалось.

2.2 Діагностична чутливість:

Визначається як ймовірність аналізу позитивної оцінки у присутності конкретного аналізу.

На додаток до першого дослідження оцінки ефективності, для подальшої оцінки діагностичної чутливості пристрою нещодавно було оцінено 262 позитивних зразки. Відповідні результати, зібрані з семи різних лотів пристрою, показують діагностичну чутливість 100%.

3. ТОЧНІСТЬ:

Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох лотах та на двох зразках різної реакційної здатності проти НВсAg, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах:

BCAV.CE: Лот 1202

Негативний контроль (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	1.943	1.939	1.924	1.935
CV	0.081	0.078	0.103	0.087
KB%	4.2	4.0	5.3	4.5

Калібратор (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.143	0.147	0.148	0.146
CV	0.014	0.017	0.018	0.016
KB%	9.8	11.4	12.1	11.1
Co/S	2.8	2.7	2.6	2.7

BCAV.CE: Лот 0702

Негативний контроль (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.163	2.110	2.106	2.126
CV	0.105	0.088	0.139	0.111
KB%	4.9	4.2	6.6	5.2

Калібратор (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.182	0.193	0.195	0.190
CV	0.018	0.023	0.019	0.020
KB%	10.0	12.0	9.9	10.6
Co/S	2.5	2.2	2.3	2.3

BCAV.CE: Лот 0702/2

Негативний контроль (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.278	2.098	2.130	2.169
CV	0.135	0.126	0.159	0.140
KB%	5.9	6.0	7.5	6.5

Калібратор (N = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.198	0.190	0.199	0.134
CV	0.023	0.023	0.027	0.025
KB%	12.1	12.3	13.5	12.6
Co/S	2.4	2.2	2.2	2.3

Змінюваність, наведена в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразка.

Важливе зауваження:

Дані про продуктивність були отримані на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 12.

5. ПРОЦЕДУРНІ ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або інактивація тепла зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшим змінюванням рівня аналізу. Цей тест підходить тільки для тестування окремих зразків, а не пулованих. 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»
вул. Петлюри, будинок 25,
м. Івано-Франківськ, 76018, Україна
Тел.: +38 (67) 000-20-22
Електронна адреса: info@labua.com.ua



UA.TR.116