

**ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ HBs АНТИГЕНУ, ПЕРША ВЕРСІЯ
ULTRA**

Кат. №: **LUA-SAG1ULTRA.CE.96** Дата випуску інструкції: **2019/11**
Кількість тестів: **96** Версія: **5**

Імуноферментний аналіз четвертої генерації (ІФА) для визначення поверхневого Антигену Гепатиту В або HBsAg у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз четвертого покоління (ІФА) для одноетапного визначення поверхневого антигену гепатиту В або HBsAg у плазмі та сироватці людини. Набір призначений для скринінгу одиниць крові, здатний виявляти мутанти HBsAg і знаходить застосування для 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 голки 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 небезпекою 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 її виліквати.

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.»

Поверхневий антиген гепатиту В або HBsAg - найважливіший білок оболонки вірусу гепатиту В, що відповідає за гострий та хронічний вірусний гепатит. Поверхневий антиген містить детермінанту "а", загальну для всіх відомих вірусних підтипів, яка імунологічно розрізняється двома різними підгрупами (ау та ad).

Здатність виявляти HBsAg за допомогою високочутливих імуноаналізів за останні роки привела до розуміння його поширення та епідеміології у всьому світі та докорінно знизила ризик зараження при переливанні.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Суміш моноклональних антитіл миші, специфічних для детермінант "а", "d" та "у" HBsAg, фіксується на поверхні мікролунок. Сироватку/плазму пацієнта додають у мікролунку разом з другою сумішшю моноклональних антитіл миші, кон'югованих з пероксидазою хрому (HRP) та спрямованих проти іншого епітопу детермінанти "а" та проти "preS".

Специфічний імунокомплекс, утворений у присутності HBsAg у зразку, захоплюється твердою фазою. В кінці одноетапної інкубації мікролунки промивають для видалення нез'язаних білків сироватки та кон'югату HRP.

Потім додають хромоген/субстрат і, у присутності захопленого імунокомплексу HBsAg, безбарвний субстрат гідролізується зв'язаним кон'югатом HRP із забарвленим кінцевим продуктом. Після блокування оптична щільність ферментативної реакції вимірюється зчитувачем ІФА. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості HBsAg, присутнього у зразку.

Версія ULTRA особливо підходить для автоматичних скринінгів і здатна виявляти мутантів "s".

D. КОМПОНЕНТИ

Стандартна конфігурація містить реактиви для виконання 192 тестів і складається з таких компонентів:

1. Мікропланшет MICROPLATE

2 шт. 12 смужок по 8 лунок, покритих анти-HBsAg, аффіно очищеними мишачими моноклональними антитілами, специфічними для детермінант "а", "у" та "d", і запечатані у мішечок з осушувачем.

2. Негативний контроль CONTROL -

1x4,0 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить сироватку кози, 10 мМ фосфатного буферу рН 7,4 +/- 0,1, 0,09% Na-азиду та 0,045% ProClin 300 в якості консервантів. Негативний контроль блідо-жовтого кольору.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4,0 мл/флакон. Готовий до використання контроль. Він містить сироватку кози, неінфекційний рекомбінантний HBsAg, 10 мМ фосфатного буферу рН 7,4 +/- 0,1, 0,02% сульфату гентаміцину та 0,045% ProClin 300 в якості консервантів. Позитивний контроль зеленого кольору.

4. Калібратор CAL

2 флакони. Ліофілізований калібратор. Розчиняється у воді класу ІФА, як зазначено на етикетці. Містить фетальну бичачу сироватку, неінфекційний рекомбінантний HBsAg при 0,5 МО/мл (2-й міжнародний стандарт ВООЗ щодо HBsAg, код NIBSC 00/588), 10 мМ фосфатного буферу рН 7,4 +/- 0,1, 0,02% сульфату гентаміцину та 0,045% ProClin 300 в якості консервантів.

Примітка: Обсяг, необхідний для розчинення вмісту флакону, може змінюватися від лоту до лоту. Будь ласка, використовуйте правильний обсяг, зазначений на етикетці.

5. Концентрат буферу для промивання WASHBUF 20X

2x60 мл/пляшки. 20-кратний концентрований розчин.

Після розведення промивний розчин містить 10 мМ фосфатного буферу pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

6. Розчинник ферментного кон'югату **CONJ DIL**

2x 16 мл/флакон. Готовий до використання розчин рожево/червоного кольору.

Він містить 10 мМ трис-буферу pH 6,8 +/- 0,1, 1% нормальної мишачої сироватки, 5% BSA, 0,045% ProClin 300 та 0,02% сульфат гентаміцину в якості консервантів. Розчин зазвичай опалесцентний.

7. Ферментний кон'югат **CONJ 20X**

2 x 1 мл/флакон. 20X концентрований реагент. Він містить мічені пероксидазою хрому (HRP) моноклональні антитіла миші до HBsAg, детермінанти "a" та "preS", 10 мМ трис-буфер pH 6,8 +/- 0,1, 5% BSA, 0,045% ProClin 300 та 0,02% сульфат гентаміцину в якості консервантів.

8. Хромоген/Субстрат **SUBS TMB**

2 x 25 мл/пляшка. Містить 50 мМ буферний розчин цитрат-фосфату при pH 3,5-3,8, 4% диметилсульфоксид, 0,03% тетра-метилбензидин (TMB) та 0,02% перекис водню (H₂O₂).

Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці як чутливий до сильного освітлення.

9. Сірчана кислота **H2SO4 0.3 M**

1x25 мл/пляшка. Містить 0.3 M розчину H₂SO₄.

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

10. Ущільнювальна фольга для планшета x 4 шт

11. Вкладиш інструкції

Важлива примітка:

Тільки за спеціальним запитом LABUA може постачати реагенти для 96, 480, 960 тестів, як повідомляється нижче:

Мікропланшети	№ 1 1x2мл/флакон	№ 5 1x10мл/флакон	№ 10 1x20мл/флакон
Негативний контроль	1x2мл/флакон	1x10мл/флакон	1x20мл/флакон
Позитивний контроль	№ 1 флакон	№ 5 флаконів	№ 10 флаконів
Калібратор	№ 1 флакон	№ 5 флаконів	№ 10 флаконів
Концентрат буферу для промивання	1x60мл/флакон	5x60мл/флакон	4 x 150мл/флаконів
Ферментний кон'югат	1x0.8мл/флакон	1x4мл/флакон	2x4мл/флакон
Розчинник для кон'югату	1x16мл/флакон	2x40мл/флакон	2x80мл/флакон
Хромоген/Субстрат	1x25мл/флакон	2x42мл/флакон	2x125мл/флакон
Сірчана кислота	1x15мл/флакон	2x40мл/флакон	2x80мл/флакон
Ущільнювальна фольга для планшета	№ 2	№ 10	№ 20
Інструкція	№ 1	№ 1	№ 1
К-сть тестів	96	480	960
Код LUA-SAG1ULTRA.CE	96	480	960

Е. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (150 мкл, 100 мкл та 50 мкл) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (подвійно дистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллям, 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 обертання при 1300 об/хв +/- 150, налаштований на +37 °С.
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (зчитування) та з 620-630 нм (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.
- Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові та компонентів крові, він повинен використовуватися у лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи подібним органом) для проведення такого типу аналізу.
- 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.

- Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
- 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 дії сильного світла та уникати вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
- Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
- Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
- Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказує на будь-яку істотну втрату активності до 6 повторних використань пристрою та до 6 місяців.
- 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.
- Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
- 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 протягом 20 хв.
- 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.
- Сірчана кислота є подразником. 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.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- 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 спостерігається.
- Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливає на ферментативну активність кон'югату, генеруючи хибнонегативні результати.
- Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
- 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. Зразки зі зміненим шляхом коагуляції, що представляють частинки після забору крові та приготування сироватки/плазми як ті, що надходять від пацієнтів з гемодіалізом, можуть дати походження хибнопозитивних результатів.

- Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °С 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 виийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °С 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.
- Якщо присутня деяка каламутність або підозрюється наявність мікрочастинок після розморожування, відфільтруйте зразок на одноразовому фільтрі 0,2-0,8µ, щоб очистити його для тестування, або скористайтесь двоетапним альтернативним методом.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не виявило жодної відповідної втрати активності до 6 повторних використань пристрою та до 6 місяців.

1. Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягнути кімнатної температури (близько 1 години).

Переконайтеся, що осушувач не набув зеленого кольору, 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 °С. Після першого відкриття смужки, що залишилися, 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 перемішати на вортексі. Позитивний контроль не містить інфекційного HBV, оскільки він складається з рекомбінантного синтетичного HBsAg.

4. Калібратор:

Додайте до ліофілізованого порошку об'єм води марки ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі. Розчин не є стабільним. Зберігайте калібратор замороженим у аліквотах при -20 °С.

5. Концентрат буфера для промивання:

Перед використанням, 20-кратний концентрований розчин слід розбавити водою класу ІФА до 1200 мл і обережно повністю перемішати. Оскільки у флаконі можуть бути присутніми деякі кристали солі, то їх слід розчинити під час приготування розчину. У процесі приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність миття.

Примітка: після розведення, розчин для промивання стабільний 1 тижня при температурі +2...8°C.

6. Ферментний Кон'югат:

Робочий розчин готують шляхом розведення 20-кратного концентрованого реагенту в Кон'югаті.

Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Уникайте будь-якого забруднення рідини окислювальними хімікатами, пилом або мікробами. Якщо цей компонент необхідно перенести, використовуйте тільки пластикові стерильні одноразові контейнери.

Важлива примітка: Робочий розчин нестабільний. Підготуйте лише обсяг, необхідний для роботи на день. Як приклад, коли набір використовується в поєднанні з іншими інструментами або вручну, розведіть 0,1 мл 20X Кон'югату з 1,9 мл Розчинника Кон'югату в одноразовий пластиковий флакон і ретельно перемішайте перед використанням.

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 піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

8. Сірчана кислота:

Готова 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:

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 вперіть 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 регулярне знезараження (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 °С (допуск ±1 °С) 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.
- У випадку **коливань** під час інкубації, прилад повинен забезпечити 350 об/хв ±150. Амплітуда коливання дуже важлива, оскільки вона неправильна, то може спричинити розбрикування, а отже, і хибнопозитивний результат.
- 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 M NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/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 помилково позитивних реакцій.
- Час інкубації має допуск ± 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА** повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм та другим фільтром 620-630 нм, обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (а) пропускання здатність ≤ 10 нм; (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.
- 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 розділах «Перевірка 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 реактивні зразки, що призводять до хибно позитивних результатів. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується для скринінгу крові та коли кількість зразків, що підлягають тестуванню, перевищує 20-30 одиниць за пробіг.

8. При використанні автоматичних пристроїв у разі, якщо тримач флакону в приладі не підходить до флаконів, що входять до набору, перенесіть розчин у відповідні контейнери та позначте їх тією самою етикеткою, вилученою з оригінального флакону. Ця операція важлива для того, щоб уникнути невідповідності вмісту флаконів при їх передачі. Коли тестування закінчиться, поверніть вторинні марковані контейнери до температури 2..8 ° C, щільно закривши їх.
9. **Обслуговування клієнтів LABUA** пропонує користувачеві підтримку в налаштуванні та перевірці інструментів, що використовуються в поєднанні з набором, для забезпечення повної відповідності описаним вимогам. Також, надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

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. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розведіть 20X концентрований Ферментний кон'югат з його розчинником, як повідомляється.
5. Розчиніть Калібратор як описано вище.
6. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте, як описано.
7. Встановіть інкубатор ІФА на +37 ° C і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивання, як повідомляється в конкретному розділі.
8. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до зчитування.
9. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
10. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
11. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
12. У разі виникнення проблем, не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівника.

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.

Автоматизоване проведення аналізу:

Якщо тест проводиться автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо приладу видати спочатку 150 мкл контролів та калібратор, потім усі зразки і, нарешті, 100 мкл розведеного Ферментного Кон'югату. Для етапу попереднього миття (пункт 1 процедури аналізу) та всіх наступних операцій дотримуйтесь інструкцій з експлуатації, наведених нижче для Ручного проведення аналізу.

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

Ручне проведення аналізу:

1. Помістіть необхідну кількість смужок у пластиковий тримач і промийте їх один раз для зволоження лунок. Уважно визначте лунки для контролю, калібратора та зразків.

Важлива примітка: Попереднє промивання (1 цикл: внесення 350 мкл/лунку промивного розчину + аспірація) має фундаментальне значення для отримання достовірних та конкретних результатів як у ручних, так і в автоматичних процедурах. Не пропустіть це!

2. Залишіть лунку А1 порожньою для бланкування.
3. Піпетуйте 150 мкл Негативного контролю у трьох примірниках, 150 мкл Калібратора у двох примірниках та 150 мкл Позитивного контролю в одному примірнику, а потім по 150 мкл кожного зі зразків.
4. Перевірити наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця в кольорі між порожніми та повними лунками) або зчитуванням при 450/620 нм. (зразки показують значення ОЩ вище 0,100).
5. Внесіть 100 мкл розведеного Ферментного кон'югату у всі лунки, окрім А1, яка використовується для бланкування.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не доторкнутися до внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки, коли додаєте кон'югат. Може статися забруднення.

6. Перевірте, чи після додавання кон'югату колір зразків змінився з жовтуватого на рожевий/червоний, а потім інкубуйте мікропланшет протягом **120 хвилин при +37 ° C**.

Важливі примітки:

- a. Смужки слід заклеювати клейкою ущільнювальною фольгою, лише коли тестування виконується вручну. Не закривайте смужки під час використання автоматичних приладів ІФА.
 - b. Якщо процедура проводиться при коливанні, обов'язково дайте обороти, зазначені у Розділі I.3, інакше може статися забруднення всередині лунки
7. Після закінчення першої інкубації, промийте мікролунки, як було описано раніше (розділ I.4)
 8. Піпетуйте 200 мкл Хромогену/Субстрату у всі лунки, включаючи А1.

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

9. Інкубуйте мікропланшет, захищаючи від світла, при **18-24 ° C протягом 30 хв**. Позитивний контроль, калібратор і позитивні зразки у лунках перетворюються з прозорих на сині.
10. Піпетуйте 100 мкл Сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 8, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю, калібратора та позитивних зразків з блакитного на жовтий/коричневий.
11. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.6, за допомогою фільтра при 450 нм (зчитування) та при 620-630 нм (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1.

Важливі загальні примітки:

1. Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців або пилу перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.
2. Зчитування повинно проводитися відразу після додавання сірчаної кислоти, 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. Якщо зразки, що підлягають тестуванню, не є чистими або зберігалися в замороженому вигляді, рекомендується описана нижче процедура аналізу, якщо вона набагато менш чутлива до інтерференції через гемоліз, гіперліпемію, бактеріальне зараження та мікрочастинки фібрину. Аналіз проводять у два етапи при +37 ° C при коливанні при 350 об/хв ±150 таким чином:
 - Додайте 100 мкл контролів, калібратора та зразків
 - Інкубуйте 60 хв при +37°C при струшуванні
 - Промити згідно інструкцій (розділ I.4)
 - Додайте 100 мкл розведеного ферментного трейсера
 - Інкубуйте 30 хв при +37°C при струшуванні
 - Промийте
 - Додайте 100 мкл суміші ТМБ та H₂O₂

- інкубуйте при к. т. при струшуванні
 - зупиніть та зчитайте
- У цій процедурі попереднє промивання можна не проводити.
Цей метод демонструє продуктивність, подібну до стандартної, і тому може використовуватися альтернативно.

4. Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок граничного значення, а отже, на розрахунок результатів тестувань. Калібратор можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Операції	Процедура
Крок попереднього промивання	1 цикл
Контролі, калібратори та зразки	150 мкл
Розведений ферментний кон'югат	100 мкл
1-а інкубація	120 хв.
Температура	+37 °C
Кроки промивання	5 циклів із 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Хромоген/Субстрат	200 мкл
2-а інкубація	30 хв.
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл
Зчитування ОЩ	450нм/620-630нм

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

		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 NC = Негативний контроль CAL = Калібратор
PC = Позитивний контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Щоразу, коли використовується набір, проводиться перевірка на контролях, щоб перевірити настільки кваліфікована ефективність аналізу. Контролюйте відповідність наступних даних:

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ 450 нм
Негативний контроль (NC)	< 0.050 середнє ОЩ 450 нм значення після бланкування
Калібратор 0.5 МО/мл	S/Co \geq 2
Позитивний контроль	> 1.000 ОЩ450нм значення

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 >0.100 ОЩ450нм	1. що розчин Хромогену/Субстрату не забруднився під час аналізу
Негативний контроль (NC) > 0.050 ОЩ450нм після бланкування	1. що процедура промивання та налаштування вошера є такими, як було підтверджено 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 (додавання позитивного контролю замість негативного); 4. що не відбулося забруднення негативного контролю або лунок, у які він був доданий,

	через розливи позитивних зразків або ферментного кон'югату; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Калібратор S/Co < 2	1. що процедура була проведена правильно. 2. що під час його дистрибуції не було допущено жодної помилки (наприклад: видача негативного контролю замість калібратора); 3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими, як підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
Позитивний контроль <1.000 ОЩ450нм	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не було допущено жодної помилки (внесли негативний контроль замість позитивного. У такому випадку, негативний контроль буде мати значення ОЩ450нм >0.050). 3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими як, було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла будь-яка із вищезазначених проблем, повідомте про це керівнику для подальших дій.

Важливе зауваження:

Аналіз слід проводити так, як і на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 11.

P. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань розраховуються за допомогою граничного значення cut-off, визначеного на середньому значенні ОЩ450нм/620-630нм негативного контролю (NC) за такою формулою:

$$NC + 0.050 = \text{Cut-Off (Co)}$$

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

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

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення ОЩ 450 нм/620-630 нм (S) та значення Cut-Off (Co) (або S/Co), згідно з наступною таблицею:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Сумнівний
> 1.1	Позитивний

Негативний результат вказує на те, що пацієнт не інфікований ВГВ, і що можна робити переливання крові.

Будь-якого пацієнта, який має сумнівний результат, слід повторно протестувати з другим зразком, взятим через 1-2 тижні після першого зразка; не слід переливати одиницю крові.

Позитивний результат свідчить про зараження вірусом гепатиту В, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином або утилізувати одиницю крові.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений шляхом повторення тестування на зразку, після фільтрації його на фільтрі 0,2-0,8 μ , щоб усунути будь-які інтерференції мікрочастинок. Тоді, якщо зразок все ще позитивний, перед

встановленням діагнозу вірусного гепатиту, зразок необхідно подати на підтверджувальний тест.

3. Коли результати тестування передаються з лабораторії в інший відділ, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
4. Встановлювати і передавати пацієнту діагноз щодо інфекції вірусного гепатиту повинен відповідний кваліфікований лікар.

Приклад розрахунку наведено нижче (дані, отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 11):

Наведені нижче дані або реальні цифри, отримані користувачем не можна використовувати.

Негативний контроль: 0,012 - 0,008 - 0,010 ОЩ450нм

Середнє значення: 0,010 ОЩ450нм

Менше 0,050 – Прийнято

Позитивний контроль: 2.489 ОЩ450нм

Вище 1000 – Прийнято

Cut-off = 0,010 + 0,050 = 0,060

Калібратор: 0,350 - 0,370 ОЩ450нм

Середнє значення: 0,360 ОЩ450нм

S/Co = 6.0

S/Co вище 2,0 – Прийнято

Зразок 1: 0,028 ОЩ450нм

Зразок 2: 1,690 ОЩ450нм

Зразок 1 S/Co < 0,9 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1,1 = позитивний

Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Загальних технічних специфікаціях або CTS (стаття 5, глава 3 Директиви IVD 98/79/ЄС). У дослідженні, проведеному для валідації нової версії, версія ULTRA виявилася принаймні еквівалентною оригінальному дизайну.

1. Аналітична чутливість

Межа виявлення аналізу була розрахована за 2-м міжнародним стандартом ВООЗ, код NIBSC 00/588. У наведеній нижче таблиці наведені результати для трьох лотів (P1, P2 і P3) версії ULTRA у порівнянні з референсним пристроєм (Реф.):

ВООЗ МО/мл	Лот P1 S/Co	Лот P2 S/Co	Лот P3 S/Co	Реф. S/Co
0.4	4.6	4.8	4.6	4.6
0.2	2.3	2.4	2.4	2.4
0.1	1.4	1.4	1.5	1.2
0.05	0.8	0.8	1.0	0.7
0.025	0.6	0.6	0.6	0.4
FCS (NC)	0.3	0.2	0.3	0.1

Аналіз показує, що аналітична чутливість краща, ніж 0,1 ВООЗ МО/мл HBsAg.

Крім того, дві панелі чутливості, що постачаються EFS, Франція, та SFTS, Франція, були протестовані і дали в найкращих умовах такі результати:

Панель EFS Ag HBs HB1-HB6 лот 04

ID зразка	Характеристики	нг/мл	S/Co
HB1	Розчинник	/	0,2
HB2	adw2+ayw3	0.05	0,6
HB3	adw2+ayw3	0.1	1,0
HB4	adw2+ayw3	0.2	1,8
HB5	adw2+ayw3	0.3	2,4
HB6	adw2+ayw3	0.5	4,2

Панель чутливості SFTS, Франція, Ag HBs 2005

ID зразка	Характеристики	нг/мл	S/Co
171	Adw2+ayw3	2.21 ± 0.15	15,4
172	Adw2+ayw3	1.18 ± 0.10	8,7
173	Adw2+ayw3	1.02 ± 0.05	6,1
174	Adw2+ayw3	0.64 ± 0.04	4,0
175	Adw2+ayw3	0.49 ± 0.03	3,4
176	Adw2+ayw3	0.39 ± 0.02	2,6
177	Adw2+ayw3	0.25 ± 0.02	2,0
178	Adw2+ayw3	0.11 ± 0.02	1,3
179	Adw2+ayw3	0.06 ± 0.01	0,9
180	Adw2+ayw3	0.03 ± 0.01	0,8

181	Adw2	0.5 – 1.0	4,7
182	Adw4	0.5 – 1.0	3,6
183	Adr	0.5 – 1.0	4,5
184	Ayw1	0.5 – 1.0	5,1
185	Ayw2	0.5 – 1.0	6,4
186	Ayw3	0.5 – 1.0	7,3
187	Ayw3	0.5 – 1.0	5,8
188	Ayw4	0.5 – 1.0	6,9
189	Ayr	0.5 – 1.0	6,1
190	розчинник	/	0,6

Панель № 808, що постачається компанією Boston Biomedical Inc., США, також була протестована для визначення межі чутливості. Результати в найкращих умовах такі:

ВВІ панель PHA 808

ID зразка	Характеристики	нг/мл	S/Co
01	ad	2,49	10,2
02	ad	1,17	4,8
03	ad	1,02	4,3
04	ad	0,96	3,8
05	ad	0,69	2,9
06	ad	0,50	2,2
07	ad	0,41	1,5
08	ad	0,37	1,3
09	ad	0,30	1,2
10	ad	0,23	1,0
11	ay	2,51	11,2
12	ay	1,26	5,9
13	ay	0,9	4,1
14	ay	0,77	3,7
15	ay	0,63	2,0
16	ay	0,48	2,4
17	ay	0,42	2,0
18	ay	0,33	1,8
19	ay	0,23	1,6
20	ay	0,13	1,1
21	негативний	/	0,6

2. Діагностична чутливість:

Діагностична чутливість була протестована відповідно до того, що вимагається Загальними технічними специфікаціями (CTS) Директиви 98/79/ЄС щодо IVD для тестування HBsAg.

Позитивні зразки, включаючи підтипи HBsAg та панель мутантів «s» з найбільш частих мутацій, були зібрані з різних патологій ВГВ (гострий, асимптоматичний та хронічний гепатит В) або виготовлені синтетично, і були виявлені позитивними в аналізі.

Усі відомі підтипи HBsAg, "ay" та "ad", та ізоформи "w" та "r", поставлені CNTS, Франція, були протестовані в аналізі і, як і очікувалося, визначалися набором.

Загальне значення 100% було виявлено в дослідженні, проведеному на загальній кількості понад 400 позитивних зразків з оригінальним референсним кодом IVD SAG1.CE, з маркуванням CE.

Всього було вивчено 30 сероконверсій, більшість з яких виготовлено компанією Boston Biomedica Inc., США.

Результати, отримані шляхом вивчення восьми панелей, поставлених компанією Boston Biomedica Inc., США, наведені нижче для версії ULTRA у порівнянні з кодом референсного пристрою SAG1.CE.

ID Панелі	1-й зразок позитивний	HBsAg підтип	HBsAg нг/мл	Версія ULTRA S/Co	Реф. Пристрій S/Co
PHM 906	02	ad	0.5	3.7	1.4
PHM 907 (M)	06	ay	1.0	4.4	2.9
PHM 909	04	ad	0.3	1.2	0.8
PHM 914	04	ad	0.5	1.1	1.1
PHM 918	02	ad	0.1	1.8	0.5
PHM 923	03	ay	<0.2	2.2	1.2
PHM 925	03	Ind.	n.d.	1.4	0.9
PHM 934	01	ad	n.d.	1.0	0.8

3. Діагностична специфічність:

Визначається як ймовірність аналізу негативної оцінки за відсутності конкретного аналізу. На додаток до першого дослідження, було досліджено понад 5000 негативних зразків від донорів крові (два центри крові), класифікованих як негативні з пристроєм із маркуванням CE, що

використовується у лабораторії збору, діагностичну специфічність недавно оцінили шляхом загального тестування 2288 негативних донорів крові на семи різних лотах. Було встановлено, що значення специфічності становить 100%.

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

Жодної хибної реакційної здатності через метод приготування зразків не спостерігалось.

Заморожені зразки, також тестували, щоб перевірити, чи заморожування зразків не впливає на результати випробування. На чистих та без частинок зразках інтерференції не спостерігалось.

Були досліджені зразки, отримані від пацієнтів з різними вірусними (HCV, HAV) та невірусними патологіями печінки, які можуть перешкоджати тестуванню. Перехресних реакцій не спостерігалось.

4. Точність

Для версії ULTRA була розрахована на двох зразках, досліджених у 16 повторях у 3 різних пробігах для трьох лотів. Результати подано в таких таблицях:

Середні величини загальна к-сть = 144	Негативний зразок	Калібратор 0.5 МО/мл
ОЩ450нм	0.026	0.332
СВ	0.004	0.027
КВ %	16%	8%

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

5. ОБМЕЖЕННЯ

Повторювані хибнопозитивні результати були оцінені на щойно зібраних зразках у менш ніж 0,1% нормальної популяції, переважно через високі титри Гетерофільних анти-мишачих антитіл (НАМА).

Інтерференції у свіжих зразках також спостерігалися, коли вони були без частинок або були погано зібрані (див. Розділ G).

Старі або заморожені зразки, що містять фібринові згустки, кріоглобуліни, міцели, що містять ліпіди, або мікрочастинки після зберігання або розморожування, можуть дати хибнопозитивні результати.

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.pro



UA.TR.116