

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ ГЕПАТИТУ А

## HAV Ab

Кат. № : AVAB.CE

Дата випуску інструкції: 2019/11  
Версія: 4



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

**ІФА для визначення антитіл до вірусу гепатиту А у сироватці та плазмі людини**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Ферментний імуноаналіз (ІФА) для визначення антитіл до вірусу гепатиту А у плазмі та сироватці людини. Набір використовується для спостереження за пацієнтами, інфікованими HAV. Тільки для діагностики in vitro.

### В. ВСТУП

Центр контролю захворювань або CDC, Атланта, США, визначає вірус гепатиту А так:

Гепатит А продовжує залишатися однією з найбільш поширених хвороб у світі, які можна попередити за допомогою вакцин, незважаючи на ліцензування вакцини проти гепатиту А в 1995 році. Широко поширена вакцинація відповідних сприйнятливих груп населення істотно знизить захворюваність і потенційно усуне місцеву передачу інфекції вірусу гепатиту А (HAV).

HAV, агент РНК 27-нм, класифікований як пікорнавірус, може викликати як безсимптомну, так і симптоматичну інфекцію у людей після середнього інкубаційного періоду 28 днів (діапазон 15-50 днів). Захворювання, спричинене HAV-інфекцією, зазвичай має раптовий початок симптомів, які можуть включати лихоманку, нездужання, анорексію, нудоту, дискомфорт у животі, темну сечу та жовтяницю. Ймовірність появи симптомів при HAV-інфекції залежить від віку людини. У дітей віком до 6 років більшість (70%) інфекцій протікають безсимптомно; якщо захворювання все-таки виникає, воно зазвичай не супроводжується жовтяницею. У дітей старшого віку та дорослих інфекція зазвичай протікає симптоматично, причому жовтяниця зустрічається у понад 70% пацієнтів. Ознаки та симптоми зазвичай тривають менше 2 місяців, хоча 10-15% осіб із симптомами мають тривале або рецидивуюче захворювання, яке триває до 6 місяців.

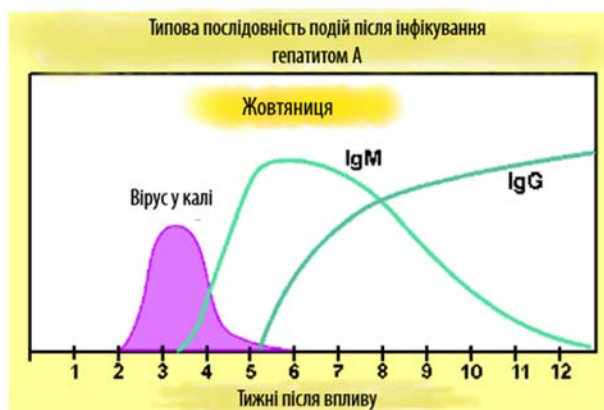
У інфікованих осіб, HAV реплікується в печінці, виділяється з жовч і виходить з калом. Пік інфекційності припадає на 2-тижневий період до появи жовтяниці або підвищення рівня печінкових ферментів, коли концентрація вірусу в калі найбільша. Після появи жовтяниці концентрація вірусу в калі знижується. Діти та немовлята можуть виділяти HAV протягом більш тривалого періоду, ніж дорослі, до кількох місяців після початку клінічного захворювання. Хронічного виділення HAV з калом не відбувається; однак виділення може виникнути у людей, які мають рецидивуюче захворювання. Віремія виникає незабаром після зараження і зберігається протягом періоду підвищення рівня печінкових ферментів.

Гепатит А не можна відрізнити від інших типів вірусного гепатиту лише на основі клінічних або епідеміологічних ознак. Для підтвердження діагнозу гострої інфекції ВГА потрібне серологічне дослідження для виявлення антитіл імуноглобуліну М (IgM) до капсидних білків HAV (IgM anti-HAV). У більшості людей анти-HAV IgM виявляється за 5-10 днів до появи симптомів і може зберігатися до 6 місяців після зараження. Імуноглобулін G (IgG) анти-HAV, який з'являється на початку інфекції, залишається виявленим протягом усього життя людини і забезпечує довільний захист від захворювання. Доступні комерційні діагностичні тести для виявлення IgM та загального (IgM та IgG) анти-HAV у сироватці крові.

РНК HAV можна виявити в крові та калі більшості людей під час гострої фази інфекції за допомогою методів ампліфікації нуклеїнових кислот, а для визначення спорідненості ізолятів HAV використовується секвенування нуклеїнових кислот.

Інфекція HAV передається переважно фекально-оральним шляхом або при контакті від людини до людини, або при вживанні зараженої їжі чи води. У рідкісних випадках інфекція HAV передається шляхом переливання крові або продуктів крові, зібраних від донорів під час віремійної фази їх інфекції. У експериментально інфікованих нелюдських приматів HAV був виявлений у слині під час інкубаційного періоду; однак передача через слину не була продемонстрована. Залежно від умов, HAV може бути стабільним у навколишньому середовищі протягом місяців. Для інактивації HAV необхідно нагрівати продукти при температурі понад 185 F (85 C) протягом 1 хвилини або дезінфікувати поверхні розчином гіпохлориту натрію 1:100 (тобто побутового відбілювача) у водопровідній воді.

Оскільки більшість дітей мають безсимптомні або нерозпізнані інфекції, вони відіграють важливу роль у передачі HAV і служать джерелом інфекції для інших. В одному дослідженні дорослих без ідентифікованого джерела інфекції 52% їхніх домогосподарств включали дитину віком до 6 років, і наявність маленької дитини була пов'язана з передачею HAV всередині домогосподарства. У дослідженнях, де проводилося серологічне тестування домашніх контактів дорослих без ідентифікованого джерела інфекції, 25%-40% контактних осіб віком до 6 років мали серологічні ознаки гострої інфекції ВГА (IgM анти-HAV).



### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз заснований на принципі конкуренції, коли антитіла у зразку конкурують із специфічним антитілом до HAV, міченим HRP, за фіксовану кількість антигену на твердій фазі. Очищений та інактивованим HAV наноситься на мікролульки.

Сироватку/плазму пацієнта додають до мікролульки, і антитіла до HAV захоплюються твердою фазою.

Після промивання додається ферментний кон'югат, який зв'язується з вільним антигеном HAV, якщо він ще присутній.

Планшет промивають для видалення незв'язаного кон'югату, а потім додають хромоген/субстрат. У присутності пероксидази безбарвний субстрат гідролізується до забарвленого кінцевого продукту, оптична щільність якого може бути виявлена і вона є обернено пропорційною кількості антитіл до HAV, присутніх у зразку. До зразка додається добавка безпосередньо в лунку, щоб блокувати перешкоди, здатні замаскувати присутність антитіл, які з'являються переважно після вакцинації.

### D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

#### 1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покриті очищеним та інактивованим HAV, запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітись до кімнатної температури. Знову закрийте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 2..8°C (°C).

#### 2. Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4+/-0.1, 0.02% гентаміцину сульфат і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль має біло-жовтий колір.

#### 3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, антитіла до HAV у концентрації вище 100 мМО/мл ВООЗ (mIU/ml), 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 7.4+/-0.1, 0.02% гентаміцину сульфат і 0.045% ProClin 300 як

консерванти. Позитивний контроль позначений зеленим кольором.

#### 4. Калібратор: CAL...

1 флакон. Ліофілізований. Розчиняти водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, антитіла до HAV в концентрації близько 10 мМО/мл ВООЗ (mIU/ml), 10 мМ (mM) фосфатний буфер рН 7.4+/-0.1, 0.02% гентаміцину сульфату і 0.045% ProClin 300 як консерванти.

**Примітка: об'єм, необхідний для розведення вмісту флакону, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний обсяг, зазначений на етикетці.**

#### 5. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Перед використанням розбавити дистильованою водою до 1200 мл (ml). Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера рН 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 і 0.045% ProClin 300.

#### 6. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання розчин. Містить кон'юговані антитіла з пероксидазою хрому, специфічні до HAV, у присутності 10 мМ (mM) трис-буферу рН 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфату як консервантів. Реагент забарвлюється червоним барвником.

#### 7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатного буферу, рН 3.5-3.8, 0.03% тетра-метил-бензидину або TMB і 0.02% перекису водню або H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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

#### 8. Розчинник для зразка: DILSPE

1x8 мл (ml). Буферний розчин пропонується використовувати під час подальшого спостереження за вакцинацією. Містить 0,09% азиду натрію і 0,045% ProClin 300 як консерванти. Колір реагенту темно-зелений.

#### 9. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)

#### 10. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.

#### 11. Вкладиш інструкції 1 шт.

#### За запитом:

#### Калібрувальна крива: CAL N°...

5x2,0 мл/флакон (ml/vial). Готова до використання та кольорова стандартна крива в діапазоні: 0-5-10-50-100 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml). (CAL1=0 мМО/мл (mIU/ml), CAL2=5 мМО/мл (mIU/ml), CAL3=10 мМО/мл (mIU/ml), CAL4=50 мМО/мл (mIU/ml), CAL5=100 мМО/мл (mIU/ml)). Містить білки сироватки, 0,3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0,045% ProClin 300 GC як консерванти. Стандарти синього кольору.

#### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (150 мкл (μl), 100 мкл (μl) та 50 мкл (μl) одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллям, 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) (допуск +/-0,1°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. 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.

3. 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 (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, 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. Рекомендується, 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 щодо 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). Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
11. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
12. 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 теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
13. 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.
14. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
15. 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, EDTA 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, даючи помилково негативні результати.
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  $+ 2^{\circ} \dots + 8^{\circ} \text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) 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 виїняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при  $-20^{\circ} \text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) 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. (min) 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 продуктивності до 3 місяців після першого відкриття.

### 1. Мікролунки, покриті антигеном:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект консервації. У цьому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при  $+2^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ). При першому відкритті невикористані смужки стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться 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 класу ELISA, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі. Розчинений калібратор не стабільний; зберігати в замороженому вигляді у аликвотах при  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ).

### 5. Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою до 1200 мл (ml) і обережно перемішати обертанням з денця на кришку. Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при  $+ 2\text{--}8^{\circ} \text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ). Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

### 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 піддавайте сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

### 8. Розчинник для зразків:

Готови до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

### 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

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%.

2. Інкубатор ІФА слід встановити на  $+37^{\circ} \text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) (допуск +/-  $0.5^{\circ} \text{C}$  ( $^{\circ}\text{C}$ )) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубацій 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 M NaOH).

5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл/лунку ( $\mu\text{l}/\text{well}$ ) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками.

Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.

4. Час інкубації має допуск  $\pm 5\%$ .

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 (a) пропускну здатність  $\leq 10$  нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до  $\geq 2.0$ ; (c) лінійність до  $\geq 2.0$ ; (d) повторюваність  $\geq 1\%$ . 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. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.

- Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

#### L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЯ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат (ТМВ+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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.
- Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
- Розчиніть калібратор як описано вище та обережно перемішайте.
- Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
- Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
- Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
- Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
- Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
- Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
- У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

#### M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залишіть 1 лунку порожньою для бланкування. Зберігати інші смужки в пакеті разом з осушувачем при +2..8 °C (°C), герметично закритими.
- Додайте 50 мкл (μl) Розчинника для зразків у всі лунки для зразків та контролів/калібратора; окрім A1. Потім піпеткою внесіть 100 мкл (μl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) калібратора в двох примірниках, 100 мкл позитивного контролю один раз і потім 100 мкл (μl) зразків. Перевірте, чи правильно додано контролю/калібратор і зразки. Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хв.**
- Промийте мікропланшет як описано у розділі I.3.
- У всі лунки, крім A1, внесіть піпеткою 100 мкл ферментного кон'югату. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хвилин.**  
**Важливо:** Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.
- Промити мікропланшет як описано.
- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) суміші ТМВ/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> у кожну лунку, включаючи бланк-лунки. Перевірте, чи правильно додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.**

**Важлива примітка:** не піддавайте сильному прямому світлу, оскільки може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) сірчаної кислоти в кожну лунку, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 6. Потім виміряйте інтенсивність кольору за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) і 620-630 нм (nm) (віднімання фону), бланкуючи інструмент на лунці A1 (обов'язково).

#### 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.

#### N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Розчинник для зразків	50 мкл (μl)
Контролі/Калібратор (*)	100 мкл (μl)
Зразки	100 мкл (μl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 мкл (μl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>20 хв</b>
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

#### (\*) Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-off, тому він не впливає на розрахунок результатів тесту.
- Калібратор (CAL) використовується тільки в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче у таблиці 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 NC = Негативний Контроль CAL(\*) = Калібратор – не обов'язковий PC = Позитивний контроль S = Зразок

#### O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, виконується контроль, щоб перевірити, чи відповідають очікуваним значенням ОЩ 450 нм (nm) або Co/S, в аналізі.

Переконайтеся, що дотримані наступні параметри:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	< 0.750 Середнього значення ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
Позитивний контроль	< 0.300 Значення ОЩ 450 нм (nm)

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.  
Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, оскільки дані недійсні.

Проблема	Перевірка
<b>Бланк-лунка</b> >0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин хромогену/субстрату не був забруднений під час аналізу
<b>Негативний контроль (NC)</b> <0.750 ОЩ450 нм (nm) після бланкування  Коефіцієнт варіації > 30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтвержені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного контролю замість негативного контролю); 4. що жодного забруднення негативного контролю або лунок, куди був доданий контроль, не відбулося через позитивні проби, розлив або кон'югат ферменту; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або кон'югатом ферменту 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
<b>Позитивний контроль</b> >0.300 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали негативний контроль замість позитивного); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

Якщо використовується Калібратор, перевірте наступні дані:

Параметр	Вимоги
Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml) ВООЗ	Co/S $\geq$ 1.0

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, то слід діяти наступним чином:

Проблема	Перевірка
<b>Калібратор</b>  Co/S < 1.0	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції калібратора не допущено жодної помилки; 3. що процедура миття та налаштування вошера перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.

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

#### Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань обчислюють за допомогою граничного значення cut-off, визначеного за такою формулою:

$$\text{Cut-off} = (\text{NC} + \text{PC}) / 3$$

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 ІФА,

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 OD450 нм (nm) зразка та значення cut-off (або Co/S), відповідно до наступної таблиці:

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

Негативний результат вказує на те, що пацієнт не інфікований HAV. Будь-якого пацієнта, який має сумнівний результат, слід повторно протестувати на другому зразку, відібраному через 1-2 тижні після забору першого зразка.  
Позитивний результат свідчить про минулу або недавню інфекцію HAV, тому пацієнта слід відповідно лікувати.

Приклад обчислення показаний нижче.

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

Негативний контроль: 1.900 – 2.000 – 2.100 ОЩ450 нм (nm)  
Середнє значення: 2.000 ОЩ450 нм (nm)  
Вище, ніж 0.750 – Прийнято

Позитивний контроль: 0.100 ОЩ450 нм (nm)  
Нижче, ніж 0.300 – Прийнято

$$\text{Cut-off} = (2.000 + 0.100) / 3 = 0.700$$

Калібратор: 0.400 - 0.360 ОЩ450 нм (nm)  
Середнє значення: 0.380 ОЩ450 нм (nm)  
Co/S > 1 – Прийнято

Зразок 1: 0.050 ОЩ450 нм (nm)  
Зразок 2: 1.900 ОЩ450 нм (nm)  
Зразок 1 Co/S > 1.1 позитивний  
Зразок 2 Co/S < 0.9 негативний

#### Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз вірусного гепатиту має поставити і передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією.

#### Р. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

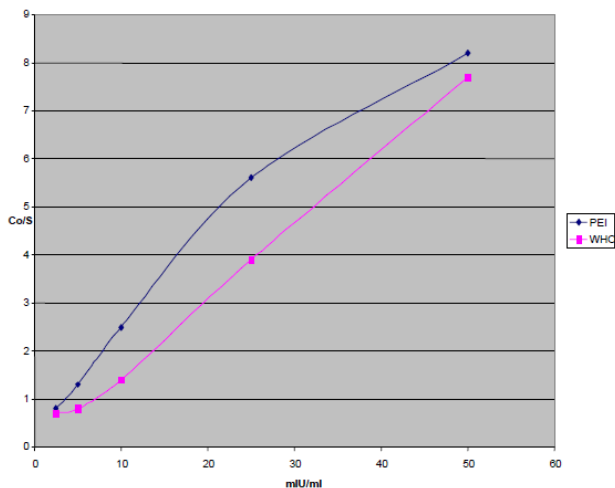
##### 1. Межа виявлення

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою 2-го міжнародного стандарту, наданого ВООЗ. Також було досліджено два контрольні зразки, надані Boston Biomedica Inc., США, з кодами Accurap 52 та 120. Чутливість, яку показує аналіз, становить < 10 мМО/мл (mIU/ml) ВООЗ або < 5 PEI мМО/мл (PEI mIU/ml).

Результати контролю якості наведені в наступній таблиці:

ВООЗ мМО/мл (mIU/ml)	ОЩ450 нм (nm)	Co/S	PEI МО/мл (PEI mIU/ml)	ОЩ450 нм (nm)	Co/S
50	0.099	7.7	50	0.093	8.2
25	0.197	3.9	25	0.137	5.6
10	0.543	1.4	10	0.304	2.5
5	0.943	0.8	5	0.587	1.3
2.5	1.015	0.7	2.5	0.949	0.8
Нег. контроль	2.217		Нег. Контроль	2.217	
Accurap 52	0.060	12.7	Accurap 120	0.115	6.6

Криві показані нижче:



## 2. Діагностична чутливість:

Діагностична чутливість була перевірена в ході клінічних випробувань на панелях зразків, які були класифіковані як позитивні за допомогою набору, схваленого FDA США. У дослідженні, проведеному на загальній кількості понад 200 зразків, було виявлено загальне значення 100%. Також досліджувалися панелі сероконверсії та продуктивності. Нижче наведено результати, отримані при дослідженні двох панелей, наданих Boston Biomedica Inc., США.

### Панель сероконверсії: PHT 902

Зразок	ОЩ450 нм (nm)	Co/S	DiaSorin
CTRL (-)	1.968	0.3	
CTRL (+)	0.084	<b>8.1</b>	
Калібратор	0.470	<b>1.5</b>	
PHT902			
1	1.878	0.4	Нег
2	1.501	0.5	Нег
3	0.090	<b>7.6</b>	Поз
4	0.123	<b>5.6</b>	Поз
5	0.120	<b>5.7</b>	Поз

### Панель продуктивності: PHT 201

Зразок	ОЩ 450 нм (nm)	Co/S	DiaSorin	Зразок	ОЩ 450 нм (nm)	Co/S	DiaSorin
1	0.169	<b>0.4</b>	Поз	14	0.139	<b>4.9</b>	Поз
2	0.132	<b>5.2</b>	Поз	15	0.115	<b>5.9</b>	Поз
3	0.143	<b>4.8</b>	Поз	16	0.167	<b>4.1</b>	Поз
4	0.104	<b>6.6</b>	Поз	17	0.086	<b>8.0</b>	Поз
5	0.438	<b>1.6</b>	Поз	18	0.160	<b>4.3</b>	Поз
6	0.121	<b>5.7</b>	Поз	19	0.175	<b>3.9</b>	Поз
7	0.127	<b>5.4</b>	Поз	20	1.772	0.4	Нег
8	0.150	<b>4.6</b>	Поз	21	0.090	<b>7.6</b>	Поз
9	0.115	<b>5.9</b>	Поз	22	0.201	<b>3.4</b>	Поз
10	0.094	<b>7.3</b>	Поз	23	0.281	<b>2.4</b>	Поз
11	0.070	<b>9.8</b>	Поз	24	0.134	<b>5.1</b>	Поз
12	1.814	0.4	Нег	25	0.142	<b>4.8</b>	Поз
13	0.097	<b>7.1</b>	Поз	Нег	1.780	0.4	Нег

## 3. Діагностична специфічність:

Діагностична специфічність була визначена на панелях негативних зразків від нормальних людей і донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою набору, схваленого FDA США. Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалося.

Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи не впливає це на результати тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалося. Були досліджені зразки, отримані від пацієнтів з різними вірусними (HCV, HDV, HBV, ВІЛ) та невірусними патологіями печінки, які можуть перешкоджати проведенню тесту. Перехресної реакції не спостерігалося.

Дослідження оцінки ефективності, проведене у зовнішньому референсному центрі на більш ніж 1000 зразках, показало значення > 98%.

## 4. Точність

Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на двох зразках з різною анти-HAV реактивністю, досліджених у 16 повтореннях у трьох окремих запусках:

### Тест №: 1

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	2.425	0.608
СВ	0.065	0.023
КВ%	2.7	3.9

### Тест №: 2

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	2.373	0.573
СВ	0.107	0.034
КВ%	4.5	6.0

### Тест №: 3

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	2.478	0.554
СВ	0.108	0.023
КВ%	4.4	4.2

Змінюваність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразків.

## 5. ОБМЕЖЕННЯ

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналіту. Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на підставі одного результату дослідження. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

## ЛІТЕРАТУРА

1. CDC. Summary of notifiable diseases, United States, 1997. MMWR 1998;46:1-87.
2. CDC. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 1996;45(RR-15).
3. Krugman S, Giles JP. Viral hepatitis: new light on an old disease. JAMA 1970;212:1019-29.
4. Hadler SC, Webster HM, Erben JJ, Swanson JE, Maynard JE. Hepatitis A in day-care centers: a communitywide assessment. N Engl J Med 1980;302:1222-7.
5. Lednar WM, Lemon SM, Kirkpatrick JW, Redfield RR, Fields ML, Kelley PW. Frequency of illness associated with epidemic hepatitis A virus infection in adults. Am J Epidemiol 1985;122:226-33.
6. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. Medicine 1992;71:14-23.
7. Skinj J P, Mathiesen LR, Kryger P, M Iler AM. Faecal excretion of hepatitis A virus in patients with symptomatic hepatitis A infection. Scand J Gastroenterol 1981;16:1057-9.
8. Tassopoulos NC, Papaevangelou GJ, Ticehurst JR, Purcell RH. Faecal excretion of Greek strains of hepatitis A virus in patients with hepatitis A and in experimentally infected chimpanzees. J Infect Dis 1986;154:231-7.
9. Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, et al. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. J Infect Dis 1991;164:476-82.
10. Sjogren MH, Tanno H, Fay O, et al. Hepatitis A virus in stool during clinical relapse. Ann Intern Med 1987;106:221-6.
11. Lemon SM. The natural history of hepatitis A: the potential for transmission by transfusion of blood or blood products. Vox Sang 1994;67(suppl 4):19-23.
12. Bower WA, Nainan OV, Margolis HS. Duration of viremia in naturally-acquired hepatitis A viral infections. [Abstract 103] In: Abstracts of the



- Infectious Diseases Society of America 35th Annual Meeting. Alexandria, VA: Infectious Diseases Society of America, 1997.
13. Liaw YF, Yang CY, Chu CM, Huang MJ. Appearance and persistence of hepatitis A IgM antibody in acute clinical hepatitis A observed in an outbreak. *Infection* 1986;14:156-8.
  14. Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. *J Infect Dis* 1995;171(suppl 1):S9-14.
  15. Hutin YJF, Pool V, Cramer EH, et al. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. *N Engl J Med* 1999;340:595-602.
  16. Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, McCaustland KA, Evatt BL. Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. *Transfusion* 1998;38:573-9.
  17. Cohen JI, Feinstone S, Purcell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 1989;160:887-90.
  18. McCaustland KA, Bond WW, Bradley DW, Ebert JW, Maynard JE. Survival of hepatitis A virus in feces after drying and storage for 1 month. *J Clin Microbiol* 1982;16:957-8.
  19. Favero MS, Bond WW. Disinfection and sterilization. In: Zuckerman AJ, Thomas HC, eds. *Viral hepatitis, scientific basis and clinical management*. New York, NY: Churchill Livingstone, 1993:565-75.
  20. Staes C, Schlenker T, Risk I, et. al. Source of infection among persons with acute hepatitis A and no identified risk factors, Salt Lake County, Utah, 1996 [Abstract 302]. *Clin Infect Dis* 1997;25:411.
  21. Smith PF, Grabau JC, Werzberger A, et al. The role of young children in a community-wide outbreak of hepatitis A. *Epidemiol Infect* 1997;118:243-52.
  22. Williams I, Bell B, Kaluba J, Shapiro C. Association between chronic liver disease and death from hepatitis A, United States, 1989-92 [Abstract A39]. IX Triennial International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Rome, Italy, April 1996.
  23. Akriviadis EA, Redeker AG. Fulminant hepatitis A in intravenous drug users with chronic liver disease. *Ann Intern Med* 1989;110:838-9.
  24. Willner IR, Uhl MD, Howard SC, Williams EQ, Riely CA, Waters B. Serious hepatitis A: an analysis of patients hospitalized during an urban epidemic in the United States. *Ann Intern Med* 1998;128:111-4.

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



#### ВИРОБНИК

##### **DIA.PRO**

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

##### **ТОВ ДІА.ПРО**

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



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

