

НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО ВІРУСУ ГЕПАТИТУ А

HAV IgM

Кат. № : **AVM.CE**

Дата випуску інструкції: **2019/12**
Версія: **4**



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

Імуноферментний аналіз (ІФА) «захоплення» для визначення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл класу IgM до вірусу гепатиту А у плазмі та сироватці людини за системою «захоплення». Набір можна використовувати для ідентифікації вірусного агента, що спричиняє гепатит у пацієнта, та спостереження за гострою фазою інфекції.

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 довічний захист від захворювання. Доступні комерційні діагностичні тести для виявлення IgM та загального (IgM та IgG) анти-HAV у сироватці крові.

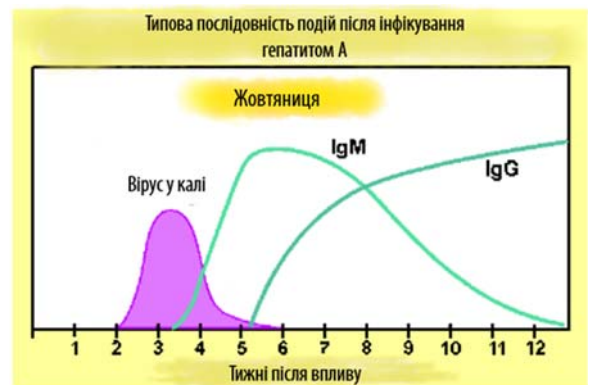
РНК HAV можна виявити в крові та калі більшості людей під час гострої фази інфекції за допомогою методів ампліфікації нуклеїнових кислот, а

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 «захоплення IgM», коли антитіла класу IgM у зразку спочатку захоплюються твердою фазою, покритою антитілами проти hlgM.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка і, зокрема, антитіл IgG, специфічні IgM, захоплені на твердій фазі, виявляють шляхом додавання очищеного препарату інактивованого HAV, міченого антитілом, кон'югованим з пероксидазою (HRP).

Після інкубації мікрорунки 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 пропорційна кількості антитіл до HAV, присутніх у зразку.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок з 8 розривних лунок, покритих антитілами проти людського IgM, афінно очищені та запечатані в пакет з осушувачем. Перед відкриттям пакета доведіть мікропланшет до кімнатної температури. Невикористані смужки необхідно повернути в пакет, а пакет запечатати і зберігати при температурі 2..8°C (°C) з осушувачем.

2. Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить білки сироватки кози, 10 мМ (mM) фосфатний буфер pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

Негативний контроль є безбарвним.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить анти HAV IgM, білки сироватки кози, 10 мМ (mM) трис буфер pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості

консервантів. Позитивний контроль позначений зеленим кольором.

4. Калібратор: CAL...

1 ліофілізований флакон. Розчиняти водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить антитіла IgM до HAV, 2% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.0+/-0.1, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

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

5. Концентрат буфера для промивання: WASHBUF 20X

1x60 мл/пляшка (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. 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 20X: CONJ

1x0.8 мл/флакон (ml/vial). 20X концентрований розчин. Містить кон'юговані з пероксидазою хрому антитіла, специфічні до HAV, у присутності 10 мМ (mM) трис-буфера рН 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфату в якості консервантів. Реагент забарвлюється червоним барвником.

7. HAV антиген: Ag HAV

1x16 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання розчин. Містить інактивовані та стабілізовані HAV у присутності 10 мМ (mM) Трис-буфера рН 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцин сульфату як консервантів. Реагент має червоний колір.

8. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60.0 мл (ml). Протеїновий буферний розчин для розведення зразків. Містить білки сироватки кози, 10 мМ трис-буфера рН 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Реагент має синій колір.

9. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин з рН 3.5-3.8, 0.03% тетраметилбензидину або TMB і 0.02% перекису водню H₂O₂.

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

10. Сірчана кислота: H₂SO₄ 0.3 M

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

11. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.

12. Вкладиш інструкції 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (10 мкл (μl), 100 мкл (μl) та 1000 мкл (μl) та 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 (сухий або вологий), 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/Субстрат (ТМБ та H₂O₂) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір 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 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.
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 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 (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, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.

- Сироватку та плазму можна зберігати при + 2 ° ... + 8 °С (°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 (°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 присутні частинки, 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 антитілом:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітисся до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект консервації. У такому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro. Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути та блискавку і зберігати при +2°-8°С (°С). 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. Поводитися з цим компонентом як з потенційно інфекційним, навіть якщо HAV, який в кінцевому підсумку присутній у контролі, був хімічно інактивований.

4. Калібратор:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ELISA, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі. Розчин не стабільний. Зберігати калібратор замороженим в аліквотах при -20°С (°С).

Примітка: Після розчинення калібратор не стабільний. Зберігати в аліквотах при -20°С.

5. Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням 20X концентрований розчин слід розбавити подвійно дистильованою водою до 1200 мл (ml) і обережно перемішати обертанням з денца на кришку.

Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при + 2..8 °С (°С). Під час приготування уникайте спінування, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

Примітка: після розведення, промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2..8 °С (°С).

6. Ферментний Кон'югат:

20x підготовка. Добре перемішайте на вортексі.

Будьте обережні, щоб не забруднити рідину окислювальними хімікатами, повітряним пилом або мікробами, коли реагент аспірується для використання.

7. HAV антиген:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі. Обробляйте цей компонент як потенційно інфекційний, навіть якщо HAV був хімічно інактивований.

6+7. Комплекс HAV антиген/антитіло:

Приблизно за 5-10 хвилин до використання розведіть 20-кратний концентрований Ферментний кон'югат у належному обсязі антигену HAV, необхідному для аналізу. Потім ретельно перемішайте на вортексі. Приклад: щоб запустити 2 смужки, розведіть 100 мкл (μl) ферментного кон'югату 20X у 2 мл (ml) антигену HAV.

Примітка: цей імунокомплекс нестабільний; відкиньте зайвий об'єм.

8. Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте добре на вортексі перед використанням.

9. 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.

10. 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 сильне 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.

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

- Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм (допуск +/-5%), 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%.
- Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °С (°С) (допуск +/- 0.5 °С (°С)) 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.
- 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 (μl/well) промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
- Час інкубації має допуск ± 5%.
- Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до 4; (c) лінійність до 4; (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 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 МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
- Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи 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, праїмуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
- Перевірте, 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.

- Розведіть зразки 1:101, роздавши спочатку 10 мкл (μl) зразка, а потім 1 мл (ml) Розчинника для зразка в пробірку для розведення; обережно перемішати на вортексі.
- Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач. Першу лунку залишіть порожньою для операції бланкування.
- Роздайте 100 мкл (μl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) Позитивного контролю одноразово і 100 мкл (μl) калібратора в двох примірниках у відповідні лунки. Не розбавляйте контроль та калібратор, оскільки вони готові до використання!
- Додайте 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки для зразків, а потім перевірте, чи всі лунки для зразків мають синій колір, а контроль та калібратор додані.
- Інкубуйте мікропланшет **протягом 60 хв при +37°C (°C)**.

Важлива примітка: смужки повинні бути заклеєні клейкою плівкою, що входить до набору, тільки тоді, коли тест виконується вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів ІФА.

- Приблизно за 5-10 хвилин до використання приготуйте імунокомплекс HAV Антиген/Антитіло, як було описано раніше.
- Проийміть мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) комплексу HAV антиген/антитіло в кожну лунку, крім 1-ї бланк-лунки, і накрийте герметичною плівкою. Перевірте, чи всі лунки червоного кольору, крім A1.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкнутися внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час видачі ферментного кон'югату. Може відбутися забруднення.

- Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37°C (°C)**.
- Помити мікролунки як на етапі 7.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (μl) суміші хромоген/субстрат у кожну лунку, включно з бланк- лункою. Потім інкубуйте мікропланшет **при кімнатній температурі (18-24°C (°C)) протягом 20 хвилин**.

Важлива примітка: Не піддавайте сильному прямому освітленню. Може утворитися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у всі лунки, щоб зупинити ферментативну реакцію, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 10. Додавання кислоти перетворить позитивний контроль і позитивні зразки з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, на фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язкове), гасивши інструмент на A1.

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

Контролі/Калібратор (*) Зразки розведені 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
HAV & Трейсер	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-off, тому він не впливає на 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

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

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

Переконайтеся, що дотримані наступні параметри:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ450 нм (nm)
Середнє значення негативного контролю (NC)	< 0.150 ОЩ450 нм (nm) після бланкування. Коефіцієнт варіації < 30%
Позитивний контроль	< 0.500 Значення ОЩ450 нм (nm)

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, а проведіть наступні перевірки:

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка >0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин хромогену/субстрату не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль (NC) >0.150 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 мийучий 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 ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або кон'югатом ферменту 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
Позитивний контроль <0.500 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	S/Co > 1

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

Проблема	Перевірка
Калібратор S/Co < 1	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції калібратора не допущено жодної помилки (напр.: додали негативний контроль); 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.

Важлива примітка:

Аналіз слід виконувати, як крок зчитування, описаний у розділі М, пункт 13.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати тестувань розраховуються за допомогою середнього значення ОЩ450 нм (nm) /620-630 нм (nm) негативного контролю (NC) та математичного розрахунку, щоб визначити наступну формулу граничного значення:

$$\text{Cut-off} = \text{NC} + 0.250$$

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 ОЩ450 нм (nm) зразка та значення cut-off (або S/Co), відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 0.8	Негативний
0.8 – 1.2	Сумнівний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат вказує на те, що пацієнт не переносить гостру інфекцію HAV.

Будь-якого пацієнта, який має сумнівний результат, слід повторно протестувати на іншому зразку, відбраному через 1-2 тижні після забору першого зразка.

Позитивний результат свідчить про інфекцію HAV, тому пацієнта слід відповідно лікувати.

Приклад обчислення показаний нижче (дані, отримані в процесі зчитування, описаного в розділі М, пункт 13):

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

Негативний контроль: 0.050 – 0.060 – 0.070 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.060 ОЩ450 нм (nm)

Нижче, ніж 0.150 – Прийнято

Позитивний контроль: 2.189 ОЩ450 нм (nm)

Вище, ніж 0.500 – Прийнято

$$\text{Cut-off} = 0.060 + 0.250 = 0.310$$

Калібратор : 0.550 -0.530 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.540 ОЩ450 нм (nm) S/Co = 1.7

S/Co вище, ніж 1.0 – Прийнято

Зразок 1: 0.070 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 2: 1.690 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 1 S/Co < 0.8 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.2 позитивний

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідальної лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Будь-який позитивний результат повинен бути підтверджений альтернативним методом (підтверджувальним тестом) до підтвердження діагнозу вірусного гепатиту.
3. Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
4. Діагноз вірусного гепатиту має поставити і передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Межа виявлення

За відсутності визначеного міжнародного стандарту для HAV IgM межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою наступних препаратів:

1. Accurun №: 121, що постачається компанією Boston Biomedica Inc. – США
2. Accurun №: 51, що постачається компанією Boston Biomedica Inc. – США

Ці препарати були підготовлені відповідно до інструкцій виробника, розведені розчинником для зразків (1:100), а потім додатково розведені в розчиннику для зразків для створення граничної кривої (accurun № 121).

Результати контролю якості наведені в наступній таблиці:

Препарати	Розведення	S/Co
Accurun №: 121	1:100	5.4
	1:200	4.1
	1:400	2.8
	1:800	1.9
	1:1600	1.0
Accurun №: 51	1:100	4.2

2. Діагностична чутливість:

Діагностична чутливість була перевірена на панелях зразків, класифікованих як позитивні за допомогою набору, схваленого FDA США.

Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів з гострою інфекцією HAV, що підтверджено клінічними симптомами та аналізом.

У дослідженні, проведеному на загальній кількості понад 100 зразків, було виявлено загальне значення 100%. Також досліджували сероконверсійну панель.

Нижче наведено результати, отримані при дослідженні препарату, що постачається компанією Boston Biomedica Inc., США.

Сероконверсійна панель: PHT 902

Зразок	ОЩ450 нм (nm)	S/Co	DiaSorin Реф.	
			S/Co	Оцінка
CTRL (-)	0.048	0.2		
CTRL (+)	1.736	5.8		
PHT902				
1	0.037	0.1	0.3	Нег
2	0.042	0.1	0.3	Нег
3	1.956	6.6	6.8	Поз
4	1.988	6.7	6.7	Поз
5	0.669	2.2	1.5	Поз

3. Діагностична специфічність:

Діагностична специфічність була визначена на панелях зразків, негативних з референсним набором, отриманих від нормальних осіб і донорів крові європейського походження.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, EDTA та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалось.

Заморожені зразки також були протестовані, щоб перевірити, чи не впливає це на результати тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких перешкод не спостерігалось.

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 спостерігалось.

Дослідження оцінки ефективності, проведене у зовнішньому референсному центрі на більш ніж 500 зразках, показало значення > 98%.

4. Точність

Обчислювали для двох зразків, одного негативного та одного низько позитивного, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках. Результати повідомляються таким чином:

Тест №: 1

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	0.058	0.719
СВ	0.008	0.052
КВ%	14.3	7.2

Тест №: 2

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	0.048	0.709
СВ	0.007	0.063
КВ%	13.9	8.9

Тест №: 3

Зразок	Негативний	Низько поз.
ОЩ450 нм (nm)	0.050	0.713
СВ	0.007	0.055
КВ%	13.4	7.7

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 13.

S. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність оцінюється як менше, ніж 2% від нормальної популяції, в основному через високі титри РФ.

Заморожені зразки, що містять частинки або агрегати фібрину, можуть давати хибно позитивні результати.

Бактеріальне забруднення або теплова інактивація зразка може вплинути на значення поглинання зразків з подальшою зміною рівня аналізу.

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. Dienstag J.L., "Hepatitis A Virus : identification, characterization and epidemiologic investigations". Progress in liver disease VI, Popper E., Schaffner F. (eds), pp 343-370, New York, Gruner and Stratton, 1979.
2. Duermeier W., Van der Veen J., Koster B. "ELISA in Hepatitis A". Lancet. I.: 823-824, 1978.
3. Parry J.V., (1981) "Hepatitis A infection: guidelines for the development of satisfactory assays for laboratory diagnosis". The Institute of Medical Laboratory Sciences, 38, 303-311.
4. Lindberg J., Frosner G., Hansson B.G. et al. "Serologic markers of hepatitis A and B in chronic active hepatitis". Scandinavian Journal of Gastroenterology, 13:525- 527, 1978.
5. Barbara J.A., Howell D.R., Briggs M., Parry J.V.. "Post transfusion hepatitis A". Lancet (1982), 1-738.
6. Zchoval R., Dienstag J.L., Purcell R.H. "Tests for hepatitis A virus antigen and antibody" in "Hepatitis A". Gerety R.J. (Ed), pp 33-46, Orlando, Academic Press, Inc. 1984

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

ТОВ ДІА.ПРО

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



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

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

