

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТІЛ ІgM ДО HCV

 Кат. №: **LUA-CVM.CE**

 Дата випуску інструкції: **11-2019**

 Кількість тестів: **96**

 Версія: **2**

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл ІgM до Вірусу Гепатиту С у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного/якісного визначення антитіл ІgM до Вірусу Гепатиту С у плазмі та сироватці людини. Набір призначений для спостереження за хронічними пацієнтами, інфікованими ВГС, які перебували на антивірусному фармацевтичному лікуванні. Тільки для діагностики «in vitro».

В. ВСТУП

Противірусні препарати, такі як інтерферон, який приймається сам або в поєднанні з рибавирином, можна використовувати для лікування осіб з хронічним вірусним гепатитом С.

Лікування самим тільки інтерфероном ефективно приблизно від 10% до 20% пацієнтів. Інтерферон у поєднанні з Рибавирином ефективний приблизно у 30-50% пацієнтів. Рибавірин не виявляється ефективним при застосуванні окремо.

Активна продукція антигенів ВГС у печінці хронічних пацієнтів викликає спайки вироблення антитіл ІgM та вивільнення специфічних для печінки ферментів, подібних до того, що відбувається у хронічних пацієнтів з ВГВ. Наявність антивірусного ІgM зазвичай корелює з фазою хвороби та клітинним пошкодженням печінки.

Під час фармацевтичного лікування ВГС ІgM може являти собою маркер для спостереження за ефективністю самого препарату, контролюючи баланс між його ефективністю та побічними ефектами, які часто можуть бути важкими для пацієнта.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті імунодомінуючими синтетичними антигенами ВГС (ядерний пептид, рекомбінантні пептиди NS3, NS4 та NS5).

Під час першої інкубації твердої фази обробляють розведеними зразками, а антиген ВГС захоплюють, якщо такий є, антигенами. Після вимивання всіх інших компонентів зразка, у 2-й інкубації зв'язані анти-ВГС ІgM виявляються шляхом додавання антитіла до ІgM, міченого пероксидазою (HRP). Фермент, захоплений на твердій фазі, діє на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл до ВГС ІgM, присутніх у зразку.

Тому присутність ІgM у зразку можна кількісно визначити за допомогою калібрувальної кривої, здатної визначити вміст антитіла в arbU/мл. Нейтралізація ІgG анти-НСV, проведена безпосередньо в лунці, проводиться в аналізі з метою блокування інтерференцій, обумовлених цим класом антитіл, при визначенні ІgM.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатню кількість реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покритих специфічними для ВГС синтетичними антигенами (ядро, пептиди NS4 та NS5 та рекомбінантний NS3). Планшети запечатані в пакет з осушувачем.

2. Калібрувальна крива: CAL N° ...

6x2.0 мл (мл)/флакон. Готова до використання та кодована кольорова стандартна крива, відкалібрована за Внутрішнім стандартом (за відсутності визначеного міжнародного), діапазон:

CAL 1 = 0 arbO/мл (U/ml)
 CAL 2 = 10 arbO/мл (U/ml)
 CAL 3 = 25 arbO/мл (U/ml)
 CAL 4 = 50 arbO/мл (U/ml)
 CAL 5 = 100 arbO/мл (U/ml)
 CAL 6 = 250 arbO/мл (U/ml)

Містить хімічно інактивовану ВГС ІgM позитивну людську плазму, 100 мМ (mM) трис-буфер рН 7.4 +/- 0.1, 0.2% Твін 20, 0.09% азид натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

Калібрувальна крива кодується синім харчовим барвником.

Важлива примітка: Навіть якщо плазма була хімічно інактивована, обробляйте цей компонент як потенційно інфекційний.

3. Буферний концентрат для промивання: WASHBUF 20X

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

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

4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x16 мл (мл)/флакон. Готовий до використання та позначений червоним кольором. Він містить кон'юговані поліклональні антитіла пероксидази хрому до людського ІgM, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.8 +/- 0.1, 0.045% ProClin 300 та 0.02% сульфату гентаміцину в якості консервантів.

5. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB

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

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

6. Сірчана кислота: H2SO4 0.3 M

1x15 мл (мл)/пляшка. Містить 0.3 M (M) розчину H2SO4.

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

7. Розчинник для зразка: DILSPE

2x60 мл (мл)/флакон. Він містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратного буфера рН 6.0 +/- 0.1, 0.2% Твін 20, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Використовується для розведення зразка.

8. Нейтралізуючий реагент: SOLN NEUT

1x8 мл (мл)/флакон. Він містить анти-ІgG кози, 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер рН 6.0 +/- 0.1, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

9. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.
10. Вкладиш інструкції x 1 шт.
Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000, 100 та 10 мкл (µl) (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу E1A (бідистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +37 °C (°C) (+/- 0.5% допуск).
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 (або ТМБ) від 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 із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до шести 6 використань пристрою та терміном до 6 місяців.
11. 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.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що 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.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

G. 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. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно виїняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягти кімнатної температури (близько 1 години). Переконайтеся, що осушувач не набув темно-зеленого забарвлення, що вказує на дефект виробництва.

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

Калібрувальна крива:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням увесь вміст концентрованого розчину слід розбавити 20x з подвійно дистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку.

Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може спричинити погану ефективність промивання.

Примітка: Після розведення промивний розчин стабільний протягом 1 тижня при +2..8 °C (°C).

Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

Якщо цей компонент доводиться переносити, використовуйте лише пластикові, можливо стерильні одноразові контейнери.

Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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

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

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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 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.

I. 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, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
2. **Інкубатор ІФА** слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні ванни, за умови, що прилад підтверджений для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очистити 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 (M) NaOH). 5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (μl)/лунку промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками. Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або голки, забиті сіллю, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
4. Час інкубації має допуск ± 5%.
5. **Зчитувач мікропланшетів ІФА** повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 нм (nm) та другим фільтром 620-630 нм (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускну здатність ≤ 10 нм (nm); (b) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (c) лінійність до ≥ 2.0; (d) повторюваність ≥ 1%. Бланкування проводиться на лунці, визначеній у розділі «Процедура аналізу». Оптичну систему зчитувача потрібно регулярно калібрувати, щоб забезпечити правильне вимірювання оптичної щільності. Її слід регулярно підтримувати відповідно до інструкцій виробника.
6. Використовувати **автоматизовані робочі станції ІФА** рекомендується при скринінгу досить великої кількості зразків (> 50 зразків). При використанні автоматизованої робочої станції ІФА всі критичні кроки (внесення, інкубація, промивання, зчитування, обробка даних) повинні бути ретельно встановлені, відкалібровані, контрольовані та регулярно обслуговуватися, щоб відповідати значенням, наведеним у розділі О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується, коли кількість зразків, що перевіряються, перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів LABUA пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором (первинний контейнер). Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями.
3. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. 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.

5. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, 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 (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
8. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції 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 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.

Можливі два методи проведення аналізу, як описано нижче:

M.1 КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ:

1. Помістіть необхідну кількість смужок у пластиковий тримач і ретельно визначте лунки для калібраторів та зразків.
2. Розведіть зразки **1:101**, додавши 1 мл (ml) Розчинника для зразків у одноразову пробірку, а потім 10 мкл (μl) зразка; перемішати на вортексі перед використанням. Не розбавляйте калібратори, оскільки вони готові до використання.
3. Залишіть лунки A1+B1 порожніми для бланкування.
4. Додайте по 50 мкл (μl) Нейтралізуючого реагенту у всі лунки, за винятком лунок A1+B1, які використовуються для бланкування, та лунок, що використовуються для калібрувальної кривої.

Важливе зауваження: Нейтралізуючий реагент здатний блокувати хібнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки на внутрішніх панелях контролю якості можуть бути виявлені негативними, якщо такі зразки були визначені позитивними за допомогою IVD, що не проводить жодної реакції блокування РФ.

5. У визначені позиції піпетувати 100 мкл (μl) калібраторів у двох примірниках, а потім 100 мкл (μl) розведених зразків. Перевірте, чи правильно додані калібратори та зразки.
6. Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37 °C (°C)**.

Важлива примітка: Смужки слід заклеювати клейкою ущільнювальною фольгою, лише коли тестування проводять вручну. Не закривайте смужки під час використання автоматичних приладів ІФА.

7. Після закінчення першої інкубації, промити мікролунки, як було описано попередньо.
8. У всі лунки, окрім A1+B1, піпетувати 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату. Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37 °C (°C)**.

Важливе зауваження: Будьте обережні, щоб не торкнутися пластикової внутрішньої поверхні лунок наконечником, коли дозується ферментний кон'югат. Можливе забруднення.

9. Після завершення другої інкубації промийте мікролунки, як описано раніше (розділ I.3)
10. Піпетувати 100 мкл (μl) Хромогену/Субстрату у всі лунки, включаючи A1+B1.

Важлива примітка: не піддавати сильному впливу прямого світла, оскільки може створюватися високий фон.

11. Інкубуйте мікропланшет, захищений від світла, **при кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**. Лунки без позитивних зразків і з позитивними калібраторами перетворюються з прозорого на синій.
12. Піпетуйте 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на кроці 10, щоб блокувати ферментативну реакцію. Додавання стоп-розчину перетворить позитивні калібратори та позитивні зразки з синіх на жовті.

13. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі 1.5, використовуючи фільтр 450 нм (nm) (зчитування) та фільтр 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи прилад на А1 або В1 або обох.

М.2 ЯКІСНИЙ АНАЛІЗ:

- Помістіть необхідну кількість смужок у пластиковий тримач і ретельно визначте лунки для калібраторів та зразків.
- Розведіть зразки **1:101**, додавши 1 мл (ml) Розчинника для зразків у одноразову пробірку, а потім 10 мкл (μl) зразка; перемішати на вортексі перед використанням. Не розбавляйте калібратори, оскільки вони готові до використання.
- Залишіть лунки А1 порожньою для бланкування.
- Додайте по 50 мкл (μl) Нейтралізуючого реагенту у всі лунки, за винятком лунки А1, яка використовується для бланкування, та лунок, що використовуються для Калібраторів.
- Потім, піпеткою додайте 100 мкл (μl) калібратора 0 arbO/мл (U/ml) у двох примірниках, 100 мкл (μl) калібратора 10 arbO/мл (U/ml) у трьох примірниках і, нарешті, 100 мкл (μl) розведених зразків. Перевірте, чи правильно додані калібратори та зразки.
- Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37 °C (°C)**.

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

- Після першої інкубації, промийте мікролунки, як зазначено у розділі 1.3.
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Ферментного Кон'югату у кожну лунку, крім лунки А1. Інкубувати мікропланшет **протягом 60 хв при +37 °C (°C)**.

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

- Після другої інкубації, промийте мікролунки, як описано попередньо (розділ 1.3).
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Хромоген/Субстрат у всі лунки, включаючи лунку А1.

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

- Інкубуйте мікропланшет, захищений від світла, **при кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин**. Лунки у які додано позитивні зразки і позитивні калібратори перетворюються з прозорих на сині.
- Піпетуйте 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що і на етапі 10, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання кислоти перетворить колір позитивного контролю та позитивних зразків з блакитного на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі 1.5, за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи прилад в лунці А1.

Загальні 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.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Нейтралізуючий реагент	50 мкл (μl)
Калібратори (без SÖLN NEUT !)	100 мкл (μl)
Розведені зразки 1:101	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв.

Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочуванням АБО 6 циклів без замочування
TMB/H ₂ O ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв.
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми видачі у кількісному аналізі:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3										
B	BLK	CAL4	S4										
C	CAL1	CAL5	S5										
D	CAL1	CAL5	S6										
E	CAL2	CAL6	S7										
F	CAL2	CAL6	S8										
G	CAL3	S1	S9										
H	CAL3	S2	S10										

Легенда: BLK = Бланк // CAL = Калібратори // S = Зразок

Нижче наведено приклад схеми видачі у якісному аналізі:

		Мікропланшет											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3											
B	CAL1	S4											
C	CAL1	S5											
D	CAL2	S6											
E	CAL2	S7											
F	CAL2	S8											
G	S1	S9											
H	S2	S10											

Легенда: BLK = Бланк // CAL = Калібратори // CS = Контрольна сироватка // S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, виконується контроль, щоб перевірити, чи є результати аналізу настільки кваліфікованими. Контролюйте відповідність наступних даних:

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 ОЩ 450 нм (nm)
Калібратор 0 arbO/мл (U/ml)	< 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування
Калібратор 10 arbO/мл (U/ml)	ОЩ 450 нм (nm) > ОЩ 450 нм (nm) CAL 0 arbO/мл (U/ml) + 0.100
Калібратор 250 arbO/мл (U/ml)	3.500 > ОЩ 450 нм (nm) > 2.000

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі, оскільки дані недійсні.

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ 450 нм (nm)	1. що розчин Хромогену/Субстрату не забруднився під час аналізу.
Калібратор 0 arbO/мл (U/ml) > 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування	1. що процедура промивання та налаштування вошера є такими, як було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний належний м'який розчин і перед використанням вошер був ним заправлений; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (додавання позитивних калібраторів замість Cal 0 arbO/мл (U/ml)); 4. що не відбулося забруднення Cal 0 arbO/мл (U/ml), 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;
Коефіцієнт варіації > 30%	

	6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Калібратор 10 arBO/мл (U/ml) < CAL 0 + 0.100	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час дистрибуції калібратора не було допущено жодної помилки. 3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими як, було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
Калібратор 250 arBO/мл (U/ml) < 2.000 ОЩ 450 нм (nm)	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час дистрибуції калібратора не було допущено жодної помилки. 3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими як, було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
Калібратор 250 arBO/мл (U/ml) > 3.500 ОЩ 450 нм (nm) 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 жодної помилки не було допущено під час аналізу; 4. що жодного забруднення Cal 250 arBO/мл (U/ml) або лунок, у які було додано, не відбулося через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були заражені позитивними зразками або ферментним кон'югатом 6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.

Якщо виникла будь-яка із зазначених вище проблем, для подальших дій повідомте про неї керівнику.

Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Якщо тест виявляється дійсним, інтерпретація результатів проводиться в **кількісному аналізі** на основі середнього значення ОЩ450нм (nm) Калібрувальної Кривої, розробленою відповідною системою підгонки кривої (пропонується: 4 параметри).

У **якісному аналізі** інтерпретація результатів проводиться на середньому значенні ОЩ450нм (nm) калібратора 10 arBO/мл (U/ml) (або CAL 2) за допомогою такої формули:

Середнє значення ОЩ 450 нм (nm) CAL2 = cut-off (Co)

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

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Q.1 КІЛЬКІСНИЙ АНАЛІЗ

Концентрації в arBO/мл (U/ml) отримують з опрацюванням зразків ОЩ 450 нм (nm) на встановленій калібрувальній кривій. Концентрація IgM з літератури корелює пропорційно з ураженням печінки, викликаним антитілами до ВГС після реплікації вірусу в гепатоцитах. Зниження концентрації IgM після фармакологічного лікування зазвичай клінічно визнається як ознака одужання та терапевтична ефективність.

Q.2 ЯКІСНИЙ АНАЛІЗ

Результати тестування інтерпретуються як співвідношення значення зразка ОЩ 450 нм (nm) (S) та граничного значення (Co) або S/Co відповідно до наведеної нижче таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
> 1.0	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що у пацієнта не розвинулися антитіла IgM до ВГС.

Позитивний результат свідчить про триваючу активну інфекцію ВГС.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати тесту передаються з лабораторії до інформаційного центру, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Діагноз повинен проводити і передавати пацієнту відповідний кваліфікований лікар.
4. Результати цього аналізу ІФА слід у будь-якому випадку застосувати з іншими діагностичними та клінічними тестами.

Приклад розрахунку наведений нижче.

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

CAL 1: 0.060 - 0.080 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.070 ОЩ 450 нм (nm)
Нижче, ніж 0.200 - прийнято

CAL 2: 0.200 - 0.220 - 0.021 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.210 ОЩ 450 нм (nm)
Вище, ніж CAL1 + 0.100 = прийнято
Cut-off або Co = 0.210

Зразок 1: 0.080 ОЩ 450 нм (nm)
Зразок 2: 1.800 ОЩ 450 нм (nm)
Зразок 1 S/Co < 1.0 = негативний
Зразок 2 S/Co > 1.0 = позитивний

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка результатів була проведена на окремих панелях у клінічному зовнішньому центрі та внутрішньо.

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл IgM до ВГС.

За відсутності міжнародного стандарту було визначено внутрішній стандарт, отриманий від пацієнта з хронічною інфекцією ВГС в анамнезі, з метою забезпечення пристрою постійною та чудовою чутливістю.

2. Діагностична чутливість та специфічність:

Діагностичні показники були оцінені у дослідженні, проведеному у зовнішньому клінічному центрі з чудовим досвідом діагностики інфекційних захворювань та ВГС.

Діагностичну чутливість досліджували приблизно на 200 зразках, попередньо отриманих позитивних тестах з аналітичною системою, розробленою клінічною лабораторією, де проводилося дослідження. Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів з клінічною історією інфекції ВГС (гострої та хронічної).

Крім того, були розглянуті деякі панелі сероконверсії, придбані у Boston Biomedica Inc., США.

Діагностична специфічність була визначена на панелях з більш ніж 300 негативних зразків від нормальних осіб та донорів крові, класифікованих як негативні для антитіл до ВГС з контрольним набором, що використовується у лабораторії, включаючи потенційно інтерферуючі зразки. Також було досліджено панель потенційно інтерферуючих зразків (РФ+, гемолізованих, ліпемічних тощо). На досліджуваних зразках інтерференцій не спостерігалось.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА 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 тестування. На чистих зразках та без частинок інтерференції не спостерігалось.

Отримано такі значення оцінки ефективності:

Чутливість	> 98%
Специфічність	> 98%

3. Відтворюваність:

Розраховували на двох зразках, досліджених повторно в різних пробігах. Результати наведені нижче у таблиці:

Середні значення К-сть = 48	Калібратор 2 10 arbO/мл (U/ml)	Калібратор 5 100 arbO/мл (U/ml)
ОЩ 450 нм (nm)	0.241	1.632
СВ	0.027	0.113
КВ%	11.3	6.9

5. ОБМЕЖЕННЯ

Помилкова позитивність становить менше ніж 2% нормальної популяції, переважно через високі титри РФ.

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати, можуть давати 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.com.ua



UA.TR.116