НАБІР

ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИГЕНА HDV

Кат. №: ***LUA-DAG.CE*** *Дата випуску інструкції:* ***12-2019***
Кількість тестів: ***96*** *Версія:* ***3***

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення Вірусу Гепатиту Дельта у сироватці та плазмі людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз третього покоління (ІФА) для визначення вірусу гепатиту дельта або HDV у плазмі та сироватці людини. Набір призначений для спостереження за пацієнтами, інфікованими HDV.
Тільки для діагностики «in vitro».

B. ВСТУП

Вірус Гепатиту Дельта або HDV-це дефектний РНК-вірус, що складається з ядра, що містить дельта-специфічний антиген, інкапсульований HBsAg, що вимагає допоміжної функції ВГВ для підтримки його реплікації. Інфікування HDV відбувається при наявності гострої або хронічної інфекції ВГВ. Коли одночасно протікає гострий дельта та гострий ВГВ, хвороба стає важкою, а клінічні та біохімічні ознаки можуть не відрізнятися від ознак, коли є лише інфекція ВГВ.
На відміну від цього, пацієнт з хронічною інфекцією ВГВ може підтримувати реплікацію HDV нескінченно довго, зазвичай з менш важким захворюванням, що проявляється як клінічне загострення.
Визначення специфічних серологічних маркерів HDV (HDV Ag, HDV Ab, HDV IgM та HDV IgG) представляє у цих випадках важливий інструмент для клініциста для класифікації етіологічного збудника, для спостереження за інфікованими пацієнтами та їх лікування.
Виявлення загальних антитіл до HDV дозволяє класифікувати захворювання та контролювати подію сероконверсії.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

HDV Ag, якщо він є у зразку, захоплюється специфічним моноклональним антитілом у першій інкубації. До зразка додають миючий засіб для розчинення специфічного антигену від частинок HDV.
У 2 -й інкубації після промивання до мікропланшету додають до мікропланшету трейсер, що складається з другого антитіла до HDV Ag, міченого пероксидазою (HRP), і зв'язується з захопленим HDV Ag. Концентрація зв'язаного ферменту на твердій фазі пропорційна кількості HDV Ag у зразку, а його активність визначається шляхом додавання хромогену/субстрату у 3-й інкубації.
Наявність HDV Ag у зразку визначається за допомогою cut-off значення, що дозволяє напівкількісно визначати антиген.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. **Мікропланшет:** MICROPLATE
   1 мікропланшет
   12 смужок х 8 відривних лунок, покритих мишачим моноклональним антитілом, специфічним до антигену HDV, і запечатані в пакет із осушувачем.
2. **Негативний контроль:** CONTROL -
   1x2.0 мл (ml)/флакон. Готовий до використання. Містить 5% альбуміну козячої сироватки, 100 мМ (mM) Трис-HCl буферу pH 7.4 +/- 0.1, 0.09% Na-азиду та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Негативний контроль має кольорове позначення блідо-жовтого кольору.
3. **Позитивний контроль:** CONTROL +
   1x2.0 мл (ml)/флакон. Ліофілізований контроль розчиняють у 2 мл (ml) бідистильованої води. Він містить 5% альбуміну козячої сироватки, неінфекційний рекомбінантний антиген HDV високого титру, 25 мМ (mM) трис-HCl буфера pH 7.4 +/- 0.1, 0.02% сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 як консерванти.
4. **Калібратор:** CAL ….
   x1 флакон. Ліофілізований калібратор. Розчиняється у воді класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить білки бичачої сироватки, неінфекційний рекомбінантний антиген HDV низького титру, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

   Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакону, може змінюватися від лоту до лоту. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.
5. **Концентрат буферу для промивання:** WASHBUF 20X
   1x60 мл (ml)/пляшку. 20-кратний концентрований розчин.
   Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буферу pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 і 0.045% ProClin 300.
6. **Ферментний кон'югат:** CONJ
   1x16 мл (ml)/флакон. Розчин готовий до використання. Містить поліклональні антитіла кон'юговані з пероксидазою хрону до антигену HDV, 10 мМ (mM) трис-буфера pH 6.8 +/- 0.1, 5% BSA, 1% нормальної сироватки миші, 0.045% ProClin 300 та 0.02% сульфату гентаміцину як консерванти. Компонент має червоний колір.
7. **Хромоген/Субстрат:** SUBS TMB
   1x16 мл (ml) флакон. Містить 50 мМ (mM) буферний розчин цитрат-фосфату при pH 3.5-3.8, 4% DMSO, 0.03% тетра-метил-бензидину або TMB, та 0.02% перекису водню H_2O_2.
   Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливим до сильного освітлення.
8. **Розчинник для зразка:** DILSPE
   1x16 мл (ml). Містить розчин 6% NP40, 0.045% ProClin 300 та 0.09% азиду натрію як консерванти у 10 мМ (mM) фосфатному буфері pH 7.4 +/- 0.1.
9. **Сірчана кислота:** H_2SO_4 0.3 M
   1x15 мл (ml)/флакон. Містить 0.3 М (M) розчину H_2SO_4.
   Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).
10. **Ущільнювальна фольга для планшету x 2 шт.**
11. **Вкладиш інструкції x 1 шт.**

E. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (150 мкл (µl), 100 мкл (µl) та 50 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (подвійно дистильована або деіонізована, 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).
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.

F. 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 ознайомлений з процедурами біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
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. Захищати Хромоген/Субстрат (ТМБ/H_2O_2) від впливу сильного світла та уникати вібрації поверхні стенду, де проводиться тестування.
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 лотами наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами одного лоту не міняли 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). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не виявило жодної відповідної втрати активності до 6 повторних використань пристрою та терміном до 3 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, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату, утворюючи помилково негативні результати.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
4. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
5. Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
6. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8u для очищення зразка перед тестуванням.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку відповідну втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 3 місяців.

Мікропланшети:

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

У цьому випадку зателефонуйте до служби підтримки клієнтів LABUA.

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

Негативний контроль:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Позитивний контроль:

Розчиніть у 2 мл (ml) води класу ІФА і добре перемішайте на вортексі перед використанням. Позитивний контроль не містить інфекційного HDV, оскільки він складається з рекомбінантного синтетичного HDV.

Примітка: *Розчинений контроль не є стабільним. Зберігати замороженими в аліквотах при -20 °C (°C).*

Калібратор:

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

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

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням, увесь вміст 20X концентрованого розчину слід розвести водою класу EIA до 1200 мл (ml) і обережно перемішати від кінця до кінця. Під час приготування уникайте піноутворення, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів 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.

Уникайте забруднення рідини 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 піддавати сильному освітленню, окислювачам та контакту з металевими поверхнями.

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

Розчинник для зразка:

Готовий до використання реагент. Обережно перемішати та уникати спінювання.

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.

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 регулярну дезінфекцію (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати. Дезінфекцію 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 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 дезінфекцію згідно з його керівництвом (пропонується дезінфекція 0.1 M (M) NaOH).
   5 циклів промивання (аспірація + дозування 350 мкл (µl)/лунку промивного розчину + 20 секунд замочування = 1 цикл) достатньо для забезпечення аналізу із заявленими характеристиками.
   Якщо замочування неможливо, додайте ще один цикл промивання. Неправильний цикл промивання або забиті сіллю голки, є основною причиною помилково позитивних реакцій.
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) пропускна 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.
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 «Валідація тесту» та «Робочі характеристики». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок через сильно реагуючі зразки, що призводить до хибнопозитивних результатів.
   Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується для скринінгу крові та коли кількість зразків, що підлягають тестуванню, перевищує 20-30 одиниць за один пробіг.
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 ПЕРЕД ПРОВЕДЕННЯМ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, 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. Переконайтесь, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть Калібратор як описано вище та обережно перемішайте.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі усі рідкі реагенти.
6. Встановіть інкубатор ІФА на +37 °C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи його розведеним промивним розчином, відповідно до інструкцій виробника. Встановіть правильну кількість циклів промивки, як повідомляється в конкретному розділі.
7. Увімкніть зчитувач ІФА принаймні за 20 хвилин до операції зчитування.
8. Якщо ви використовуєте автоматизовану робочу станцію, увімкніть її, перевірте налаштування та обов'язково використовуйте правильний протокол аналізу.
9. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
10. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
11. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

1. Помістіть необхідну кількість смужок у пластиковий тримач. Уважно визначте лунки для контролю, калібратора та зразків.
2. Залишіть лунку A1 порожньою для бланкування.
3. Піпетуйте 100 мкл (µl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (µl) калібратора в двох примірниках, а потім 100 мкл (µl) позитивного контролю в одноразовому використанні, а потім 100 мкл (µl) зразків.
4. Перевірити наявність зразків у лунках неозброєним оком (є помітна різниця в кольорі між порожніми та повними лунками) або зчитуванням при 450/620 нм (nm). (зразки показують значення ОЩ вище, ніж 10000).
5. Потім додайте 100 мкл (µl) Розчинника для зразків у всі лунки, окрім A1.
6. Інкубуйте мікропланшет протягом **120 хв при +37 °C (°C).**

Важливе зауваження: *Смуги слід заклеювати клейовою ущільнювальною фольгою, лише коли тестування проводиться вручну. Не закривати смужки під час використання автоматичних приладів ELISA.*

7. Коли перша інкубація закінчиться, промийте мікролунки, як описано раніше (розділ I.3).
8. Внесіть 100 мкл (µl) Ферментного кон'югату у всі лунки, за винятком A1, які використовуються для операцій бланкування.

Важливе зауваження: *Будьте обережні, щоб не торкнутися кінчиком піпетки внутрішньої поверхні лунки. Можливе забруднення..*

9. Після додавання кон'югату перевірте, чи колір лунок змінився на червоний, а потім інкубуйте мікропланшет **протягом 60 хвилин при +37 °C (°C).**
10. Після завершення другої інкубації промийте мікролунки, як описано раніше (розділ I.3).
11. Піпетувати 100 мкл (µl) Хромогену/Субстрату у всі лунки, включаючи A1.

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

12. Інкубуйте мікропланшет, захищений від світла, при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хв**. Лунки без

позитивного контролю та позитивних зразків перетворяться з прозорого на синій.

13. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на кроці 11, щоб зупинити ферментативну реакцію. Додавання стоп -розчину перетворить позитивний контроль і позитивні зразки з синього на жовтий.

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

Важливі зауваження:

1. *Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хибнопозитивних результатів при зчитуванні.*
2. *Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.*
3. *Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок граничного значення, а отже, на розрахунок результатів випробувань. Калібратор можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.*

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Контролі/калібратор Зразки	100 мкл (µl) 100 мкл (µl)
Розчинник для зразка	100 мкл (µl)
1-а інкубація	**120 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів з 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
2-а інкубація	**60 хв**
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів з 20 хв замочуванням АБО 6 циклів без замочування
ТМБ/H_2O_2 суміш	100 мкл (µl)
3-я інкубація	**20 хв**
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче 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
PC = Позитивний Контроль S = Зразок

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

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

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль (NC)	<0.100 ОЩ 450 нм (nm) значення після бланкування коефіцієнт варіації < 30%
Калібратор	S/Co >1
Позитивний контроль	> 1.000 ОЩ 450 нм (nm) значення

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

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

Проблема	Перевірка
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ 450 нм (nm)	що розчин хромогену/субстрату не забруднився під час аналізу
Негативний контроль (NC) > 0.100 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації > 30%	1. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний належний миючий розчин і перед використанням вошер був ним заправлений; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (видача позитивного контролю замість негативного контролю; 4. що не відбулося жодного забруднення негативного контролю або лунок, у яких роздавали контроль через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забиті.
Калібратор S/Co < 1	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час додавання калібратора не сталося помилки, наприклад: замість калібратора додали негативний контроль; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.
Позитивний контроль < 1.000 ОЩ 450 нм (nm)	1. що процедуру було проведено правильно; 2. що не було допущено жодної помилки під час додавання контролю (напр. додали негативний контроль замість позитивного контролю) 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.

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

Важливе зауваження:

Аналіз слід виконувати, як і на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 14.

P. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

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

$$\textbf{Cut-off} = \textbf{NC}_{\text{середнє значення ОЩ450нм (nm),/620-630нм (nm)}} + \textbf{0.100}$$

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

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

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати тестування інтерпретуються як співвідношення зразка ОЩ450нм (nm)/620-630нм (nm) та граничного значення cut-off (або S / Co) згідно з наступною таблицею:

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

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не заразився HDV.
Зразок пацієнта, який показав сумнівний результат, слід повторно перевірити на другому зразку, взятому через 1-2 тижні після першого зразка.
Позитивний результат свідчить про інфекцію HDV, тому пацієнта слід лікувати відповідним чином.

Важливі примітки:

1. *Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.*
2. *Будь -який позитивний результат повинен бути підтверджений шляхом тестування пацієнта на інші маркери HDV до підтвердження діагнозу вірусного гепатиту.*
3. *Коли результати тестування передаються з лабораторії в інший заклад, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.*
4. *Відповідний кваліфікований лікар повинен встановити та передати пацієнту діагноз інфекції вірусного гепатиту.*

Приклад розрахунку наведено нижче (дані, отримані на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 14):

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

Негативний контроль: 0.020 - 0.030 - 0.025 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.025 ОЩ 450 нм (nm)
Нижче ніж 0.100 - Прийнято

Позитивний контроль: 2.489 ОЩ 450 нм (nm)
Вище ніж 1.000 - Прийнято

Граничне значення (Cut-off) = 0.025+0.100 = 0.125

Калібратор: 0.280 - 0.290 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.285 ОЩ 450 нм (nm) S/Co = 2.3
S/Co вище ніж 1 - Прийнято

Зразок 1: 0.030 ОЩ 450 нм (nm)
Зразок 2: 1.800 ОЩ 450 нм (nm)
Зразок 1 S/Co <0.9 = позитивний
Зразок 2 S/Co >1.1 = негативний

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

1. Межа виявлення
Наразі немає міжнародних стандартів для виявлення антигену HDV. Внутрішній стандарт, отриманий від пацієнта на дуже ранній гострій фазі інфекції, був визначений для забезпечення пристрою постійної та оптимальної чутливості.
Межа виявлення аналізу була розрахована шляхом порівняння з комерційним європейським набором. У негативній плазмі була підготовлена гранична крива розведення. Результати контролю якості наведені в наступній таблиці:

Внутрішній стандарт

BC	Лот 1102		Лот 0103		Лот 0403		DiaSorin
розведення	ОЩ 450 нм (nm)	S/Co	ОЩ 450 нм (nm)	S/Co	ОЩ 450 нм (nm)	S/Co	S/Co
2K	0.486	4.4	0.539	4.7	0.504	4.7	4.5
4K	0.266	2.4	0.289	2.5	0.304	2.8	2.6
8K	0.151	1.4	0.144	1.3	0.163	1.5	1.3
16K	0.071	0.6	0.078	0.7	0.081	0.8	0.7
Нег. контроль	0.011	////	0.015	////	0.008	////	////

2. Діагностична специфічність і чутливість
Діагностична чутливість була перевірена на панелях зразків, класифікованих як позитивні за допомогою референсного європейського набору.
Позитивні зразки були зібрані від пацієнтів, які перенесли дуже ранню гостру інфекцію HDV.
Діагностична специфічність була визначена на панелях з більш ніж 250 негативних зразків від нормальних осіб та донорів крові, класифікованих як негативні за допомогою референсного набору.
Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку.
Жодної помилкової реакційної здатності через метод приготування зразків не спостерігалося.
Заморожені зразки також тестували, щоб перевірити, чи заморожування зразків не впливає на результати тестування. На чистих та без частинок зразках перешкод не спостерігалося.
Були досліджені зразки, отримані від пацієнтів з різними вірусними (HCV, HAV) та невірусними патологіями печінки, які можуть перешкоджати тестуванню. Перехресних реакцій не спостерігалося.
Дослідження оцінки ефективності, проведене у кваліфікованому зовнішньому довідковому центрі на більш ніж 300 зразках, надало такі значення:

Чутливість	> 98%
Специфічність	> 98%

3. Точність:
Розраховували на трьох зразках, досліджених повторно в різних пробігах.
Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках різної реакційної здатності до антигену HDV, досліджених у 16 повторах у трьох окремих пробігах:

LUA-DAG.CE: Лот 1102
Негативний контроль (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.021	0.020	0.019	0.020
СВ	0.004	0.005	0.004	0.004
КВ%	17.7	22.7	19.3	19.9

IGS при 8 K (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.167	0.166	0.169	0.167
СВ	0.006	0.008	0.005	0.006
КВ%	3.9	4.6	3.1	3.9
S/Co	1.3	1.4	1.4	1.4

IGS при 0.5 K

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.416	2.404	2.372	2.397
СВ	0.150	0.143	0.130	0.141
КВ%	6.2	5.9	5.5	5.9
S/Co	19.9	20.0	19.9	19.9

LUA-DAG.CE: Лот 0103
Негативний контроль (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.019	0.020	0.018	0.019
СВ	0.003	0.004	0.003	0.003
КВ%	17.6	19.4	17.7	18.2

IGS при 8K (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.180	0.180	0.181	0.180
СВ	0.007	0.008	0.008	0.008
КВ%	3.8	4.5	4.4	4.3
S/Co	1.5	1.5	1.5	1.5

IGS при 0.5 K

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.415	2.453	2.437	2.435
СВ	0.135	0.131	0.153	0.140
КВ%	5.6	5.3	6.3	5.7
S/Co	20.3	20.4	20.7	20.5

LUA-DAG.CE: Лот 0403
Негативний контроль (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.015	0.016	0.015	0.015
СВ	0.003	0.003	0.003	0.003
КВ%	17.7	18.8	19.3	18.6

IGS при 8K (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.170	0.169	0.172	0.170
СВ	0.008	0.008	0.008	0.008
КВ%	4.8	4.7	4.5	4.7
Co/S	1.5	1.5	1.5	1.5

IGS при 0.5 K (к-сть = 16)

Середні величини	1 аналіз	2 аналіз	3 аналіз	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.378	2.370	2.393	2.380
СВ	0.103	0.094	0.099	0.099
КВ%	4.4	4.0	4.1	4.2
S/Co	20.9	20.6	21.0	20.8

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

Важливе зауваження:
Дані про продуктивність були отримані на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 14.

S. ОБМЕЖЕННЯ
На виявлення антигену HDV у ІФА сильно впливає наявність антитіл. Після того, як у пацієнта піднімаються антитіла до HDV, HDV Ag стає неможливо виявити методом ІФА, тоді як РНК HDV можна все ще виявити за допомогою методів ПЛР.
Помилкова позитивність оцінюється у менше 2 % нормальної популяції, переважно через високий титр гетерофільних антимишачих антитіл (HAMA).
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