



АНТИТІЛА IgM ДО ВІРУСУ ГЕПАТИТУ D

Кат. №: **LUA-EIA.DIM.96**
Кількість тестів: **96**

Дата випуску інструкції: **12-2019**
Версія: **5**

Імуноферментний аналіз (ІФА) «захоплення» для визначення антитіл IgM до вірусу гепатиту Дельта у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл класу IgM до Вірусу гепатиту Дельта або HDV у плазмі та сироватці людини за системою «захоплення». Набір призначений для класифікації збудника вірусної інфекції та спостереження за пацієнтами, інфікованими HDV. Тільки для діагностики «in vitro».

В. ВСТУП

Вірус гепатиту Дельта або HDV — це РНК-дефектний вірус, що складається з ядра, яке представляє дельта-специфічний антиген, інкапсульований HBsAg, якому потрібна допоміжна функція HBV для підтримки його реплікації.

Зараження HDV відбувається при наявності гострої або хронічної інфекції HBV. Коли гостра дельта-інфекція та гострий гепатит В виникають одночасно, хвороба стає тяжкою, і клінічні та біохімічні ознаки можуть не відрізнятися від ознак інфекції HBV. Навпаки, пацієнт із хронічною інфекцією ВГВ може підтримувати реплікацію HBV необмежено довго, як правило, з менш тяжким захворюванням, що проявляється як клінічне загострення.

Визначення специфічних серологічних маркерів ВГД (HDV Ag, HDV IgM та HDV IgG) у цих випадках є важливим інструментом для клініциста, щоб класифікувати етіологічний агент, та для спостереження за інфікованими пацієнтами та їх лікуванням.

Виявлення антитіл IgM та IgG до HDV дозволяє класифікувати хворобу та контролювати сероконверсію.

С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті моноклональними антитілами до hIgM, які під час 1-ї інкубації «захоплюють» саме цей клас антитіл.

Після вимивання всіх інших компонентів зразка, під час 2-ї інкубації зв'язані антитіла IgM до HDV виявляються шляхом додавання рекомбінантного антигену HDV, імунокомплексованого зі специфічним антитілом, міченим пероксидазою (HRP).

Після промивання, фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості антитіл IgM, присутніх у зразку.

Д. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покритих очищеним специфічним моноклональним антитілом миші до IgM людини та запечатаний у пакет із осушувачем. Перед відкриттям дайте мікропланшету досягти кімнатної температури; повторно закрити невикористані смужки в пакет із осушувачем і зберігати при температурі 4°C (°C).

2. Негативний контроль CONTROL -

1x2.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання контроль. Містить антитіла людини, негативні до HDV, 3% знежиреного молока, 0.2 М Трис-буферу рН 6.0+/-0.1, 0.2% Tween 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів. Негативний контроль позначено біло-жовтим кольором.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x2.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання. Містить антитіла IgM людини, позитивні до HDV, 3% знежиреного молока, 0.2 М Трис-буферу рН 6.0+/-0.1, 0.2% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

Позитивний контроль позначено зелено-жовтим кольором.

Важлива примітка: навіть якщо цей матеріал був хімічно інактивований, поводьтеся з ним як із потенційно інфекційним.

4. Калібратор CAL...

х1 флакон. Ліофілізований реагент, що розчиняється у воді класу ІФА, як зазначено на етикетці. Містить фетальну бичачу сироватку,

антитіла IgM людини до HDV, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Важливі примітки:

1. **Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може змінюватися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.**

2. **Навіть якщо цей матеріал був хімічно інактивований, поводьтеся з ним як із потенційно інфекційним.**

5. 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.

6. Ферментний кон'югат 20X CONJ 20X

1x0.8 мл (мл)/флакон. 20-кратний концентрований розчин. Містить мічені пероксидазою поліклональні антитіла до HDV. Реагент розведений у буферному розчині, що містить 10 мМ (mM) Трис-буфера рН 6.8 +/- 0.1, 5% BSA, 0.045% ProClin 300 та 0.2 % сульфату гентаміцину як консерванти.

7. Антиген HDV Ag HDV

1x6 флаконів. Ліофілізований реагент необхідно розчинити 1.9 мл (мл) відповідним розчинником. Містить неінфекційний рекомбінантний антиген HDV, 25 мМ Трис-буфера рН 7.8+/-0.1 і 5% білків сироватки людини.

8. Розчинник для антигену HDV Ag DIL

1x16 мл (мл)/флакон. Буферний розчин для розведення ліофілізованого антигену HDV. Містить 0.2 М Трис-буфер рН 6.0+/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.2% Тритон X100. Компонент позначений червоним кольором.

9. Розчинник для зразків DILSPE

2x60.0 мл (мл)/флакон. Буферний розчин для розведення зразків. Містить 0.2 М Трис-буфер рН 6.0+/-0.1, 0.2% Твін 20, 3% знежиреного молока, 0.045% ProClin 300 і 0.09% азиду натрію як консерванти. Компонент позначено синім кольором.

10. Хромоген/Субстрат SUBS TMB

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

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

11. Сірчана кислота H₂SO₄ 0.3 M

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

12. Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.

13. Вкладиш інструкції x 1 шт.

Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікродозатори 10-1000 мкл (μl) та одноразові пластикові наконечники.
- Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.
- Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °C (°C).
- Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування).
- Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
- Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

- Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
- Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром

контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.

3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ/Н₂О₂) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стелю, 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).
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 утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
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 додавання консервантів до зразків; особливо азиду натрію, оскільки ця хімічна речовина впливатиме на ферментативну активність кон'югату.
3. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
4. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких

частинок чи 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 виїняті 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 можуть утворитися частинки, які вплинуть на результат тесту.
6. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ 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 повторних використань пристрою та терміном до 3 місяців.

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 ЛАБЮЕІ. 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 та позитивний контролі:

Готові до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Калібратор:

Ліофілізований реагент необхідно розчинити у воді класу ІФА, як зазначено на етикетці.

Примітка: Розведений калібратор не є стабільним. Зберігайте Калібратор замороженим в аліквотах при -20 °C (°C).

Концентрат буфера для промивання:

Перед використанням весь вміст 20х концентрованого розчину слід розбавити бідистильованою водою до 1200 мл (ml) 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).

Імунокомплекс:

Розчиніть ліофілізований антиген HDV з 1.9 мл (ml) Розчинника Антигена HDV і обережно перемішайте, щоб повністю розчинити вміст флакона.

Коли весь порошок розчиниться, додайте 100 мкл (µl) 20X концентрованого Ферментного Кон'югату та обережно перемішайте на вортексі.

Важливі примітки:

1. Підготовка Імунокомплексу повинна проводитися безпосередньо перед внесенням зразків та контролів на планшет.
2. Приготовлений таким чином імунокомплекс не стабільний у рідкому стані. Залишки слід заморозити в аліквотах, при -20°C (°C). Розморожуйте лише один раз і не використовуйте цей заморожений матеріал після закінчення терміну придатності набору.

Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Змішайте на вортексі перед використанням.

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.

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 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

1. Мікродозатори повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне незараження (70% 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%.

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 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 помилок позитивних реакцій.

4. Час інкубації має допуск ± 5%.

5. Зчитувач мікропланшетів ІФА повинен бути обладнаний фільтром зчитування 450 nm (nm) та другим фільтром 620-630 nm (nm), обов'язковим для бланкування. Його стандартні характеристики повинні бути (a) пропускна здатність ≤ 10 nm (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, для того, щоб відповідати значенням, зазначеним у розділі «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 необхідно вивчати та контролювати, щоб звести до мінімуму можливість забруднення сусідніх лунок через сильно реактивні зразки, що призводить до хибнопозитивних результатів. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується, коли

кількість зразків, що перевіряються, перевищує 20-30 одиниць за пробіт.

7. Служба підтримки клієнтів ЛАБЮЕІ 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 (коробка з набором). Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть Калібратор, як описано вище, і обережно перемішайте.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім обережно перемішайте на вортексі всі 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 промивання, 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 мікродозатори 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 і визначте лунки для стандартів і зразків.
2. Розведіть зразки 1:200, додавши 1 мл (ml) розчинника для зразка в одноразову пробірку, а потім 5 мкл (μl) зразка; перед використанням перемішайте на вортексі. Не розбавляйте контролі та калібратор, оскільки вони готові до використання.
3. Залишіть лунку A1 порожньою для бланкування.
4. Внесіть 100 мкл (μl) негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (μl) калібатора в двох примірниках і 100 мкл (μl) позитивного контролю в одному екземплярі.
5. Потім додайте 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки.
6. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важливі примітки:

- a. *Смужки слід герметизувати клейкою ущільнювальною фольгою, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.*
 - b. *Приготуйте імунокomплекс як описано.*
7. Після закінчення першої інкубації, промийте мікролунки, як зазначено у розділі I.3.
 8. Піпетуйте 100 мл (ml) **Імунокomплексу** у всі лунки, крім лунки A1 та інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

Важлива примітка: Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунок наконечником піпетки. Може відбутися забруднення.

9. Після закінчення другої інкубації, промийте мікролунки, як описано раніше (розділ I.3)
10. Внесіть 100 мкл (μl) Хромогену/Субстрату в усі лунки, включаючи A1.

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

- Інкубуйте мікропланшет у захищеному від світла місці при **кімнатній температурі (18-24°C (°C)) протягом 20 хвилин**. Лунки, в які додані позитивні зразки, позитивний контроль і калібратор, також зміняться з прозорих на сині.
- Додайте 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, калібратора 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'язкове), бланкуючи прилад в лунці А1.

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

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Контролі та калібратор	100 мкл (µl)
Зразки розведені 1:200	100 мкл (µl)
1-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Імунокомплекс	100 мкл (µl)
2-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Хромоген/Субстрат	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:

		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

Перевірка контролів/калібратора виконується кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають очікувані значення ОЩ450nm (nm) або S/Co в аналізі.

Перевірте відповідність наступних даних:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ450 нм (nm)
Негативний контроль	< 0.200 ОЩ450 нм (nm) після бланкування
Коефіцієнт варіації	< 30%
Калібратор	S/Co > 2.5
Позитивний контроль	> 0.900 ОЩ450 нм (nm)

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

Якщо це не так, не продовжуйте і виконайте наступні перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.100 ОЩ 450 нм (nm)	1. що під час аналізу розчин Хромоген/Субстрат не забруднився.
Негативний контроль (NC) > 0.200 ОЩ450 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 праймований; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки (внесення позитивного контролю замість негативного контролю; 4. що не відбулося жодного забруднення негативного контролю або лунок, де проводився контроль, через позитивні зразки, розливи або ферментний кон'югат; 5. що мікродозатори не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом; 6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Калібратор S/Co < 2.5	1. що процедура була правильно виконана; 2. що жодна помилка не сталася під час їх внесення; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнє забруднення калібратора.
Позитивний контроль < 0.900 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедура була правильно виконана; 2. що жодна помилка не сталася під час внесення контролю; 3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнє забруднення позитивного контролю.

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

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, як і на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 13.

P. РОЗРАХУНОК ДАНИХ

Якщо тест виявляється дійсним, результати розраховуються із середнього значення ОЩ450 нм (nm) / 620-630 нм (nm) негативного контролю (NC) за допомогою граничного значення (Co), визначеного за наступною формулою:

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

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

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення ОЩ450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка та 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 в гострій стадії інфекції HDV.

Будь-якого пацієнта, який має сумнівний результат, слід повторно обстежити, дослідивши другий зразок, відібраний у пацієнта через 1-2 тижні після першого тестування.

Позитивний результат свідчить про інфекцію HDV і в такому випадку, пацієнт повинен отримати належне лікування.

Важливі примітки:

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Будь-який позитивний зразок слід подати на Підтверджувальний Тест, зазначений у розділі Т, перш ніж надати позитивний результат. Проводячи цей тест, можна виявити хибні реакції, що призводять до неправильного тлумачення результатів аналізу, а потім виключити їх.
3. Коли результати тесту передаються з лабораторії до іншого закладу, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
4. Діагноз інфекції вірусного гепатиту повинен бути наданий пацієнту відповідним кваліфікованим лікарем.

Приклад розрахунку наведено нижче (дані отримані на етапі читання, описаному в розділі М, пункт 13).

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

Негативний контроль: 0.100 - 0.120 - 0.080 ОЩ450 нм (nm)
Середнє значення: 0.100 ОЩ450 нм (nm)
Нижче ніж 0.200 - Прийнято

Позитивний контроль: 2.000 ОЩ450 нм (nm)
Вище ніж 0.900 - Прийнято
Cut-off = 0.100 + 0.250 = 0.350

Калібратор: 0.100 - 1.100 ОЩ450 нм (nm)
Середнє значення: 1.050 ОЩ450 нм (nm) S/Co = 3.0
S/Co вище, ніж 2.5 - Прийнято
Зразок 1: 0.080 ОЩ450 нм (nm)
Зразок 2: 1.800 ОЩ450 нм (nm)
Зразок 1 S/Co < 0.9 = негативний
Зразок 2 S/Co > 1.1 = позитивний

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінку продуктивності було проведено відповідно до того, що зазначено в Загальних технічних специфікаціях або CTS (ст. 5, глава 3 Директиви IVD 98/79/ЕС).

1. Межа виявлення

CTS не визначив міжнародний стандарт для виявлення антитіл IgM до HDV.

За його відсутності було визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), отриманий від пацієнта в гострій фазі інфекції, щоб забезпечити приладу постійну та чудову чутливість.

Тому межа виявлення аналізу була розрахована на трьох партіях у порівнянні з комерційним європейським набором.

Криву граничного розведення готували у негативній плазмі.

Результати контролю якості наведені в наступній таблиці:

Внутрішній золотий стандарт (ВЗС)

ВЗС	Лот № 1102		Лот № 0103		Лот № 0403		DiaSorin
	ОЩ450 нм (nm)	S/Co	ОЩ450 нм (nm)	S/Co	ОЩ450 нм (nm)	S/Co	
1 X	0.728	2.5	0.783	2.6	0.837	2.7	2.6
2 X	0.443	1.5	0.461	1.5	0.471	1.5	1.4
4 X	0.286	1.0	0.281	0.9	0.305	1.0	1.0
8 X	0.154	0.5	0.160	0.5	0.185	0.6	0.5
Плазма -	0.039	0.1	0.054	0.2	0.065	0.2	0.2

2. Діагностична чутливість та специфічність

Діагностичні характеристики були оцінені під час оцінки продуктивності, проведеної відділом гастрогапатології професора М. Ріццетто лікарні С. Джованні Ватіста, Турін, Італія, на більш ніж 400 зразках у порівнянні з еталонним європейським набором.

Позитивні зразки були зібрані у пацієнтів, які перенесли гостру HDV-інфекцію.

Діагностична специфічність була визначена за допомогою референсного набору на панелях з більш ніж 250 негативних зразків від здорових людей і донорів крові.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів підготовки (цитрат, ЕДТА та

гепарин), так і сироватку. Жодної хибної реакційної здатності через метод підготовки зразків не спостерігалось.

Заморожені зразки також тестували, щоб перевірити, чи не заважає це тестуванню. На чистих зразках та зразках, що не містять частинок, інтерференцій не спостерігалось.

Були досліджені зразки, отримані від пацієнтів з різними вірусними (HCV, HAV) і невірусними патологіями печінки, які можуть перешкоджати тесту. Перехресної реакції не спостерігалось.

Дослідження Оцінки ефективності, проведене у кваліфікованому зовнішньому референсному центрі на більш ніж 400 зразках, дало наступні значення:

Чутливість	>98%
Специфічність	>98%

3. Відтворюваність

Було розраховано на трьох зразках досліджених у повторях у окремих пробігах. Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках із різною реактивністю IgM HDV, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах:

LUA-EIA.DIM.96: Лот № 1102

Негативний Контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.061	0.056	0.056	0.058
Стандартне відхилення	0.008	0.007	0.007	0.008
KB %	13.9	13.0	12.9	13.3

Калібратор (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.798	0.810	0.802	0.803
Стандартне відхилення	0.044	0.041	0.046	0.044
KB %	5.5	5.1	5.7	5.4
S/Co	2.6	2.6	2.6	2.6

Позитивний контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.133	2.143	2.134	2.137
Стандартне відхилення	0.081	0.081	0.095	0.086
KB %	3.8	3.8	4.4	4.0
S/Co	6.9	7.0	7.0	7.0

LUA-EIA.DIM.96: Лот № 0103

Негативний Контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.062	0.059	0.066	0.062
Стандартне відхилення	0.008	0.005	0.006	0.006
KB %	12.4	9.3	9.2	10.3

Калібратор (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.843	0.843	0.826	0.837
Стандартне відхилення	0.051	0.051	0.045	0.049
KB %	6.0	6.0	5.4	5.8
S/Co	2.7	2.7	2.7	2.7

Позитивний Контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.299	2.278	2.227	2.268
Стандартне відхилення	0.115	0.102	0.112	0.110
KB %	5.0	4.5	5.0	4.8
S/Co	7.4	7.4	7.0	7.3

LUA-EIA.DIM.96: Лот № 0403

Негативний Контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.066	0.070	0.067	0.068
Стандартне відхилення	0.006	0.008	0.008	0.007
КВ %	9.8	10.7	11.3	10.6

Калібратор (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.800	0.813	0.815	0.809
Стандартне відхилення	0.044	0.046	0.049	0.046
КВ %	5.5	5.7	6.0	5.7
S/Co	2.5	2.5	2.6	2.5

Позитивний Контроль (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.352	2.328	2.339	2.340
Стандартне відхилення	0.093	0.098	0.105	0.099
КВ %	3.9	4.2	4.5	4.2
S/Co	7.5	7.3	7.4	7.4

Варіабельність, показана в таблицях, не призвела до неправильної класифікації зразка.

Важлива примітка:

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

S. ОБМЕЖЕННЯ

Хибнопозитивний результат оцінюється як менше 2% нормальної популяції, в основному через високі титри ревматоїдного фактора. Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати, можуть дати хибнопозитивні результати.

T. ТЕСТ-ПІДТВЕРДЖЕННЯ

Тест-підтвердження необхідно провести на будь-якому позитивному зразку до того, як лікар повідомить діагноз первинної інфекції HDV. Виконайте підтвердження наступним чином:

Для підтвердження виконайте такі дії:

1. Підготуйте комплекс Антиген/Кон'югат, як описано у відповідному розділі. Цей реагент називається Розчином А.
2. Потім 25 мкл (μl) концентрованого Ферментного кон'югату розводять у 500 мкл (μl) Розчинника антигену і обережно перемішують у вортексі. Не використовуйте для цієї процедури жоден ліофілізований флакон Антигену HDV! Цей розчин називається Розчином В.
3. Лунку А1 смужки залишають порожньою для бланкування.
4. Негативний контроль розподіляється на смужці в положеннях В1+С1. Це використовується для розрахунку значення cut-off та значення S/Co.
5. Позитивний зразок, що підлягає підтвердженню, розведений у співвідношенні 1:201, вноситься на смужку в положенні D1+E1.
6. Смужку інкубують протягом 60 хвилин при +37 °C (°C).
7. Після промивання бланк-лунку А1 залишають порожньою.
8. 100 мкл (μl) Розчину А розливають у лунки В1+С1+D1.
9. Потім у лунку Е1 додають 100 мкл (μl) Розчину В.
10. Смужку інкубують протягом 60 хвилин при +37 °C (°C).
11. Після промивання 100 мкл (μl) Хромогену/Субстрату додають у всі лунки і смужку інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
12. 100 мкл (μl) Сірчаної кислоти додають у всі лунки, а потім вимірюють інтенсивність їх забарвлення при 450 нм (nm) (фільтр зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону), бланкуючи прилад на А1.

Інтерпретація результатів здійснюється наступним чином:

1. Якщо зразок у положенні D1 показує значення S/Co нижче 0.9, то, є ймовірність виникнення проблеми розподілу або забруднення у першому випробуванні. Процедуру аналізу в розділі М необхідно повторити, щоб двічі перевірити аналіз.
2. Якщо зразок в положенні D1 показує значення S/Co вище 1.1, а в положенні Е1 показує значення S/Co, все ще вище 1.1, зразок вважається **хибнопозитивним**. Реактивність зразка фактично не залежить від специфічної присутності Антигену HDV, і відбулася перехресна реакція з моноклональним антитілом, міченим HRP.

3. Якщо зразок у положенні D1 показує значення S/Co вище 1.1, а у положенні Е1 - значення S/Co нижче 0.9, то зразок вважається **істинно позитивним**. Реактивність зразка фактично залежить від конкретної присутності Антигену HDV, а не від будь-якої перехресної реакції.

Нижче наведено таблицю для інтерпретації результатів:

Лунка	S/Co		
D1	< 0.9	> 1.1	> 1.1
E1	< 0.9	> 1.1	< 0.9
Інтерпретація	Проблема з забрудненням	Хибнопозитивний	Істинно позитивний

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»
вул. Петлюри, будинок 25
м. Івано-Франківськ, 76018, Україна,
Тел.: +38 (067) 000-20-22
Електронна пошта: info@labua.com.ua



UA.TR.116