



АНТИТИЛА IGM ДО ВІРУСУ КРАСНУХИ

Кат. №: **LUA-EIA.RUBM.96**

Кількість тестів: **96**

Дата випуску інструкції: **11-2019**

Версія: **3**

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

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл класу IgM до Вірусу Краснухи у плазмі та сироватці людини за системою «захоплення». Набір призначений для спостереження за пацієнтами, інфікованими вірусом Краснухи, та моніторингу ризику вад новонароджених, спричинених вірусом Краснухи під час вагітності. Тільки для діагностики «in vitro».

B. ВСТУП

Краснуха - це невеликий сферичний вірус в оболонці діаметром 55-60 нм (nm) і єдиний представник роду Рубівірусів родини Togaviridae.

Вірус містить одну позитивну скручену молекулу РНК 42s і відомим є лише один серотип. Вірус кодує щонайменше три глікопротеїни оболонки, E1, E2a, E2b; білок, асоційований з Нуклеокапсидом, С; і два неструктурних білки.

Виявлення специфічних для Краснухи антитіл IgG та IgM є дуже важливим для серологічної діагностики як вроджених, так і первинних постнатальних інфекцій краснухи, оскільки вони можуть призвести до важких вроджених вад.

Відсутність у сироватках крові специфічних до краснухи антитіл IgG, характерних для значної тривалості після первинних інфекцій, у присутності вірусспецифічних IgM, свідчить про ризик дефектів у новонароджених немовлят.

Високоспецифічні аналізи на IgM Краснухи на основі системи захоплення IgM дають клініцисту корисний і надійний тест для моніторингу цих ризиків під час вагітності.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз ґрунтується на принципі «захоплення IgM», де антитіла класу IgM у зразку спочатку захоплюються твердою фазою, покритою антитілом проти hlgM.

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

Після інкубації мікролунок промивають для видалення незв'язаного кон'югату, а потім додають хромоген/субстрат.

У присутності зв'язаного кон'югату безбарвний субстрат гідролізується до забарвленого кінцевого продукту, оптична щільність якого може бути виявлена і пропорційна кількості антитіл IgM до Вірусу Краснухи, присутніх у зразку.

Система описує, як контролювати, чи позитивність, показана зразком, правдива чи ні (Тест підтвердження), що допомагає клініцисту правильно витлумачити результати.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покритих афінно очищеним антитілом кози до IgM людини, у присутності бичачих білків.

Пластини запечатані в пакет з осушувачем. Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриттям; повторно закрити невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігати при температурі 2..8 °C (°C).

2. Негативний контроль CONTROL -

1x4.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання контроль. Містить 1% негативну плазму до антитіл IgM вірусу Краснухи, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратного буфера pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Негативний контроль безбарвний.

3. Позитивний контроль CONTROL +

1x4.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання контроль. Містить 1% позитивної плазми крові людини до IgM вірусу Краснухи, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Na-цитратного буфера pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль кодується зеленим кольором.

4. Калібратор CAL...ml

x1 флакон, ліофілізований. Розчиняється у воді класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить позитивні антитіла IgM вірусу Краснухи людської плазми, титровану проти референсної сироватки PEI 265 МО/мл (IU/ml) для вірусу Краснухи, відкалібровану за 2-м міжнародним стандартом ВООЗ на 200 МО/мл (IU/ml) +/- 10%, ембріональну бичачу сироватку, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

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

5. Ліофілізований антиген Краснухи AG RUB

x6 флаконів, ліофілізований. Флакони містять ліофілізований УФ-інактивований вірус Краснухи в білковому буфері. Розчин містить 2% бичачих білків, 10 мМ (mM) буфера Tris HCl pH 6.8 +/- 0.1, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300.

Розчинити з 1.9 мл (мл) Розчинника Антигену, як зазначено у відповідному розділі.

6. Буферний концентрат для промивання WASHBUF 20X

1x60 мл (мл)/пляшка. 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Твін 20 та 0.045% ProClin 300.

7. Ферментний кон'югат CONJ 20X

1x0.8 мл (мл)/флакон. 20-кратний концентрований розчин специфічних до Краснухи моноклональних антитіл, мічений HRP і розведений у білковому буфері, що містить 10 мМ (mM) буфера Tris HCl, pH 6.8 +/- 0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 та 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину як консерванти.

8. Розчинник антигену AG DIL

1x16 мл (мл) флакон. Білковий буферний розчин для приготування Імунокомплексу. Розчин містить 10 мМ (mM) буфера Tris HCl pH 6.8 +/- 0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 та 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину як консерванти. Кодується реагент забарвленням червоним харчовим барвником 0.01%.

9. Розчинник для зразків DILSPE

2x60.0 мл (мл)/флакон. Буферний розчин з протеїном для розведення зразків. Він містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) цитратного буфера pH 6.0 +/- 0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% азиду натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти.

Реагент має кольорове кодування з 0.01% синім харчовим барвником.

10. Хромоген/Субстрат SUBS TMB

1x16 мл (мл)/флакон. Містить 50 мМ (mM) розчину цитратно-фосфатного буфера, pH 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 M 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.

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (1000 мкл (μl), 100 мкл (μl) і 10 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.

2. Вода класу EIA (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 (сухий або вологий), здатний забезпечити температуру +37 °С (°С) (допуск +/- 0.5 °С (°С)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Г. 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 талку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не піддавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...8 °С (°С) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, 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 вказує на будь-яку істотну втрату активності до шести використань пристрою та 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 публікації 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 °С (°С) 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.

Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. 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 чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при +2-8 °С (°С) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору. Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °С (°С) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
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.

Н. 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.

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 °С (°С). 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:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

Калібратор:

Додайте до ліофілизованого порошку об'єм води класу ЕІА, зазначений на етикетці. Дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Важлива примітка: Розчин не є стабільним. Зберігайте Калібратор замороженим в аліквотах при -20 °С (°С).

Концентрат Промивного буфера:

Перед використанням весь вміст концентрованого розчину слід розбавити бідистильованою водою класу 20x 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 °С (°С).

Комплекс Антиген/Антитіло:

Дійте обережно наступним чином:

1. Розчиніть вміст ліофілизованого флакона з 1.9 мл (ml) Розчинника Кон'югату/Антигена. Дайте повністю розчинитися ліофілизованому вмісту, а потім обережно перемішайте на вортексі.
2. Обережно перемішайте концентрований Ферментний Кон'югат на вортексі. Потім додайте 0.1 мл (ml) у флакон з розчинним антигеном Краснухи і акуратно перемішайте на вортексі.

Важливі примітки:

1. Розчиніть та підготуйте лише ту кількість флаконів, яка необхідна для тесту. Отриманий Імунокомплекс не є стабільним. Будь-який залишковий розчин зберігайте в аликвотах при -20 °C (°C).
2. Підготовка Імунокомплексу повинна проводитися **безпосередньо перед** внесенням зразків та контролів на планшет. Знову акуратно перемішайте на вортексі безпосередньо перед його використанням.

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 серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази**:

P280 - Одягати захисні рукавички/захисний одяг/захист очей/захист обличчя.

P302+P352 - ПРИ ПОПАДАННІ НА ШКІРУ: Змити великою кількістю мила та води.

P332+P313 - Якщо виникає подразнення шкіри: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P305+P351+P338 - ПРИ ПОПАДАННІ В ОЧІ: Обережно промивати водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і це легко зробити. Продовжуйте промивання.

P337+P313 - Якщо подразнення очей не зникає: зверніться за медичною консультацією/допомогою.

P362+P363 - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.

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

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, 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 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 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 ≥ 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. 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 розділах «Валідація тесту» та «Робочі характеристики аналізу». 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 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 компоненти.
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.

M.1 Автоматизований аналіз:

Якщо тест проводиться автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо, щоб прилад аспірував 1000 мкл (μl) Розчинника для зразків, а потім 10 мкл (μl) зразка (коєфіцієнт розведення 1:101). Потім весь вміст вносять у правильно визначену пробірку для розведення. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення зразків. Коли всі

зразки будуть розбавлені, переконайтеся, що прилад вносить 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки мікропланшету. Цю процедуру також можна проводити у два етапи розведення по 1:10 кожен (90 мкл (μl) Розчинника для зразків + 10 мкл (μl) зразка) у другу платформу для розведення. Потім переконайтеся, що прилад аспірує спочатку 100 мкл (μl) Розчинника для зразків, потім 10 мкл (μl) рідини з першого розведення на платформі і, нарешті, розподіліть весь вміст у відповідну лунку мікропланшету.

Не розбавляйте контролю/калібратор, оскільки вони готові до використання. Розподіліть 100 мкл (μl) калібраторів/контролю у відповідні калібрувальні/контрольні лунки. Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій з експлуатації, наведених нижче для Ручного аналізу. Настійно рекомендується перевірити, що проміжок часу між внесенням першого та останнього зразків буде розрахований приладом та врахований шляхом відповідної затримки першої операції промивання.

М.2 Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101, додавши спочатку 10 мкл (μl) зразка, а потім 1 мл (ml) Розчинника для зразків у пробірку для розведення; акуратно перемішайте на вортексі.
2. Помістіть необхідну кількість лунок у тримач мікролунок. Залиште лунку в позиції А1 порожньою для операції бланкування.
3. Розподіліть 100 мкл (μl) Негативного Контролю та 100 мкл (μl) Калібратора в дублях у правильно визначені лунки. Внесіть 100 мкл (μl) Позитивного контролю одноразово у відповідну лунку. Не розбавляйте контролю та калібратор, оскільки вони готові до використання!
4. Внесіть 100 мкл (μl) розведених зразків у відповідні лунки для зразків, а потім перевірте, чи всі лунки для зразків мають синій колір, а також що контролю та калібратор були внесені.
5. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.

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

6. Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як зазначено у розділі І.3.
7. Піпетуйте 100 мл (ml) **Імунокомплексу Антиген/Антитіло** у кожную лунку, крім лунки А1 для бланкування, і закрийте герметиком. Переконайтеся, що всі лунки червоного кольору, крім А1.

Важливі примітки: Будьте обережні, щоб не торкатися внутрішньої поверхні лунок наконечником піпетки, заповненим **Імунокомплексом Антиген/Антитіло**.

8. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C)**.
9. Промийте мікропланшет як у кроці 6.
10. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші Хромоген/Субстрат у кожную лунку, включаючи бланк-лунку. Потім інкубуйте мікропланшет протягом **20 хвилин при кімнатній температурі (18-24 °C (°C))**.

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

11. 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.
12. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі І.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:

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 лабораторії вимагає внутрішнього контролю якості.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ

Контролі та калібратор	100 мкл (μl)
Зразки розведені 1:101	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
Суміш ТМВ/Н ₂ О ₂	100 мкл (μl)
3-я інкубація	20 хв.
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (μl)
Зчитування ОЦ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

Нижче наведено приклад схеми видачі:

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

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний Контроль CAL = Калібратор PC = Позитивний Контроль S = Зразок

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Будь-коли, коли використовується набір, виконується контроль, щоб перевірити, чи відповідають заявленим характеристики аналізу. Перевірте відповідність наступних даних:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.050 Значення OD 450 нм (nm)
Середнє значення Негативного контролю (NC)	< 0.150 Середнього значення OD 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
Калібратор	S/Co > 1
Позитивний контроль	> 0.750 Значення OD 450 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 > 0.050 OD 450 нм (nm)	1. що під час аналізу розчин Хромоген/Субстрат не забруднився.
Негативний контроль (NC) > 0.150 Середнього значення OD 450 нм (nm) після бланкування	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;
Коефіцієнт варіації > 30%	

	<p>5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або ферментним кон'югатом;</p> <p>6. що голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.</p>
Калібратор S/Co < 1	<p>1. що процедура була правильно виконана;</p> <p>2. що жодна помилка не сталася під час внесення (наприклад, внесення негативного контролю замість калібратора);</p> <p>3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні;</p> <p>4. що не відбулося зовнішнє забруднення калібратора.</p>
Позитивний контроль < 0.750 OD 450 nm (nm)	<p>1. що процедура була правильно виконана;</p> <p>2. що жодна помилка не сталася під час внесення контролю (наприклад, внесення негативного контролю замість позитивного контролю);</p> <p>3. що процедура промивання та налаштування вошера підтверджені у попередньому кваліфікаційному дослідженні;</p> <p>4. що не відбулося зовнішнє забруднення позитивного контролю.</p>

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

Важлива примітка:

Аналіз слід проводити, як і на етапі читання, описаному в розділі М, пункт 12.

Р. РОЗРАХУНОК CUT-OFF

Результати випробувань розраховуються за допомогою середнього значення OD450 nm (nm)/620-630 nm (nm) Негативного контролю (NC) та математичного розрахунку, щоб визначити таку формулу для cut-off:

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

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

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

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD450 nm (nm)/620-630 nm (nm) зразка та значення Cut-off (або S/Co), згідно з наступною таблицею.

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 - 1.2	Сумнівний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт не в гострій стадії інфекції Вірусу Краснухи.

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 вірусу Краснухи.

Приклад розрахунку наведено нижче (дані отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 12).

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

Негативний контроль: 0.050 - 0.060 - 0.070 OD 450 nm (nm)
 Середнє значення: 0.060 OD 450 nm (nm)
 Нижче ніж 0.150 - Прийнято
 Позитивний контроль: 1.850 OD 450 nm (nm)
 Вище ніж 0.750 - Прийнято

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

Калібратор: 0.550 - 0.530 OD 450 nm (nm)

Середнє значення: 0.540 OD 450 nm (nm)

S/Co = 1.7

S/Co вище 1 - Прийнято

Зразок 1: 0.070 OD 450 nm (nm)

Зразок 2: 1.690 OD 450 nm (nm)

Зразок 1 S/Co < 1 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.2 = позитивний

Важливі примітки:

- Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
- Особливу увагу при інтерпретації результатів слід приділяти подальшому спостереженню за вагітністю при інфекції Вірусу Краснухи через ризик важких вад розвитку новонароджених.
- Під час моніторингу вагітності настійно рекомендується підтвердити будь-який позитивний результат спочатку за допомогою описаної нижче процедури, і, по-друге, за допомогою іншого пристрою для виявлення IgM Вірусу Краснухи, перш ніж вживати будь-яких профілактичних заходів.
- 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.
- Коли результати тесту передаються з лабораторії до іншого закладу, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
- Діагноз інфекції повинен бути наданий пацієнту відповідним кваліфікованим лікарем.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Межа виявлення

За відсутності визначеного міжнародного стандарту для IgM Краснухи, межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою таких препаратів:

- Контрольна сироватка 265 МО/мл (IU/ml) Краснуха IgG, що поставляється PEI і калібрується за міжнародним стандартом ВООЗ, позитивна на IgM Краснухи, визначена як Внутрішній золотий стандарт (IGS).
- Accurun № 141, поставляється Boston Biomedica Inc., США.

Ці матеріали були підготовлені згідно з інструкціями виробника, а потім розведені в Розчиннику для зразків.

Межа виявлення, отримана з аналізу трьох партій продукції, наведена в наступній таблиці:

Межа виявлення:

LUA-RUBM.CE	Лот № 0703	Лот № 0603	Лот № 0303
PEI/ВООЗ (IGS)	> 50 МО/мл (IU/ml)	> 50 МО/мл (IU/ml)	> 50 МО/мл (IU/ml)
VBI Accurun № 141	> 1:400	> 1:400	> 1:400

2. Діагностична чутливість

Діагностична чутливість була перевірена на панелях зразків, класифікованих позитивно за набором, схваленим FDA США.

Позитивні зразки були зібрані від пацієнтів, які перенесли вірусну інфекцію Краснухи, підтверджені клінічними симптомами та аналізом. Загальне значення > 98% було виявлено в дослідженні, проведеному на загальній кількості більше 60 зразків.

Оцінювалась також Панель продуктивності, кодована PTR 201, що постачається компанією VBI, США. Дані наводяться нижче:

VBI-США: Панель продуктивності PTR 201

ID Зразка	LUA-RUBM.CE		Реф. S/Co	ID Зразка	LUA-RUBM.CE		Реф. S/Co
	OD 450 nm (nm)	S/Co			OD 450 nm (nm)	S/Co	
1	0.121	0.3	0.2	14	0.104	0.3	0.1
2	0.194	0.6	0.5	15	0.086	0.2	0.1
3	3.287	9.6	>2.3	16	0.099	0.3	0.2
4	0.069	0.2	0.2	17	0.131	0.4	0.2
5	0.080	0.2	0.1	18	0.185	0.5	0.9
6	0.108	0.3	0.1	19	1.897	5.5	2.1
7	1.148	3.3	1.2	20	0.101	0.3	0.1
8	0.055	0.2	0.2	21	0.135	0.4	0.2

9	0.145	0.4	0.1	22	0.118	0.3	0.1
10	0.142	0.4	0.1	23	0.076	0.2	0.1
11	3.989	11.7	>2.3	24	0.995	2.9	1.0
12	0.136	0.4	0.2	25	0.163	0.5	0.3
13	0.775	2.3	0.7				

Крім того, у наведеній нижче таблиці подано дані, отримані з продуктом, випробуваним на Панелі Сероконверсії PTR 901, з посиланням на значення, отримані шляхом вивчення набору, затвердженого FDA США (дані BBI).

Панель BBI PTR 901 (Сероконверсія)

ID	LUA-RUBG.CE		Реф. S/Co
	OD 450 нм (nm)	S/Co	
01	0.095	0.2	0.2
02	0.115	0.3	0.2
03	0.108	0.3	0.2
04	0.107	0.3	0.2
05	0.154	0.4	0.2
06	0.470	1.2	0.8
07	1.731	4.6	2.8
08	0.982	2.6	2.1
09	0.511	1.3	1.1

3. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність була визначена на панелях з більш ніж 300 зразків, негативних із референсним набором, отриманих від нормальних осіб європейського походження.

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 випробовували, щоб перевірити, чи не заважає це тестуванню. На чистих зразках та зразках, що не містять частинок, інтерференцій не спостерігалось.

Дослідження, проведене на більш ніж 60 потенційно перехресно реагуючих зразках, не виявило будь-яких інтерференцій у системі.

Перехресних реакцій не спостерігалось.

Дослідження Оцінки ефективності, проведене у кваліфікованому зовнішньому референсному центрі на більш ніж 400 зразках, дало значення > 98%.

У будь-якому випадку можна визначити хибнопозитивні реакції, а потім виключити їх під час інтерпретації результатів за допомогою процедури, описаної в розділі Т, щоб перевірити, чи є позитивний результат дійсним.

4. Точність

Було розраховано на трьох зразках, негативному, низькопозитивному та позитивному, досліджених у 16 повторях у трьох окремих пробігах. Результати повідомляються наступним чином:

LUA-RUBM.CE: Лот № 0703

Негативний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.079	0.084	0.084	0.082
Стандартне відхилення	0.008	0.008	0.008	0.008
CV %	9.5	9.8	9.6	9.6

Низькорективний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.448	0.443	0.452	0.448
Стандартне відхилення	0.021	0.022	0.016	0.020
CV %	4.8	4.9	3.6	4.4

Високореактивний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.937	2.784	2.719	2.813
Стандартне відхилення	0.155	0.127	0.128	0.136
CV %	5.3	4.5	4.7	4.8

LUA-RUBM.CE: Лот № 0603

Негативний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.057	0.062	0.061	0.060
Стандартне відхилення	0.007	0.007	0.005	0.006
CV %	11.6	11.0	8.7	10.4

Низькорективний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.491	0.470	0.487	0.482
Стандартне відхилення	0.016	0.018	0.020	0.018
CV %	3.2	3.8	4.1	3.7

Високореактивний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.955	2.961	2.939	2.952
Стандартне відхилення	0.055	0.071	0.055	0.060
CV %	1.9	2.4	1.9	2.0

LUA-RUBM.CE: Лот № 0303

Негативний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.059	0.061	0.059	0.060
Стандартне відхилення	0.006	0.006	0.007	0.006
CV %	10.1	9.1	11.4	10.2

Низькорективний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	0.463	0.461	0.459	0.461
Стандартне відхилення	0.023	0.015	0.021	0.020
CV %	4.9	3.2	4.6	4.2

Високореактивний (N = 16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Середнє значення
OD 450 нм (nm)	2.910	2.907	2.913	2.910
Стандартне відхилення	0.057	0.074	0.057	0.063
CV %	2.0	2.5	2.0	2.2

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 12.

5. ОБМЕЖЕННЯ

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати, можуть дати хибнопозитивні результати.

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

Цей тест підходить тільки для випробування одиночних зразків, а не пулованих.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на основі єдиного результату тесту. Слід враховувати історію хвороби пацієнта, симптоматику та інші діагностичні дані.

Т. ТЕСТ ПІДТВЕРДЖЕННЯ

Для того, щоб надати лікарю найкращу точність у спостереженні за вагітністю, де хибнопозитивний результат може призвести до операції аборт, проводиться тест підтвердження. Перед підтвердженням діагнозу первинної інфекції вірусу Краснухи необхідно провести тест підтвердження на будь-якому позитивному зразку.

Для підтвердження виконайте такі дії:

1. Підготуйте Імунокомплекс Антиген/Антитіло, 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 Краснухи! Цей розчин називається Розчином В.
3. Лунку А1 смужки залишають порожньою для бланкування.

4. Негативний контроль розподіляється на смужці в положеннях V1+C1. Це використовується для розрахунку значення cut-off та значення S/Co.
5. Позитивний зразок, що підлягає підтвердженню, розведений у співвідношенні 1:101, вноситься на смужку в положенні D1+E1.
6. Смужку інкубують протягом 60 хвилин при +37 °C.
7. Після промивання бланк-лунку A1 залишають порожньою.
8. 100 мкл (µl) Розчину А розливають у лунки V1+C1+D1.
9. Потім у лунку E1 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 їх інтенсивність забарвлення при 450 нм (nm) (фільтр зчитування) та при 620-630 нм (nm) (віднімання фону), бланкуючи прилад на A1.

Інтерпретація результатів здійснюється наступним чином:

1. Якщо зразок у положенні D1 показує значення S/Co нижче 1.0, ймовірно, є ймовірність виникнення проблеми розподілу або забруднення у першому випробуванні. Процедуру аналізу в розділі М необхідно повторити, щоб двічі перевірити аналіз.
2. Якщо зразок у положенні D1 показує значення S/Co вище 1.2, а в положенні E1 показує значення S/Co, все ще вище 1.2, зразок вважається **хибнопозитивним**. Реактивність зразка фактично не залежить від специфічної присутності Краснухи, і відбулася перехресна реакція з моноклональним антитілом.
3. Якщо зразок у положенні D1 показує значення S/Co вище 1.2, а у положенні E1 - значення S/Co нижче 1.2, зразок вважається **істинно позитивним**. Реактивність зразка фактично залежить від конкретної присутності вірусу Краснухи, а не від будь-якої перехресної реакції.

Нижче наведено таблицю для інтерпретації результатів.

Лунка	S/Co		
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.2
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 (67) 000-20-22
 Електронна адреса: info@labua.com.ua



UA.TR.116