

АНТИТИЛА ДО HBС

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

Дата випуску інструкції: **11-2019**
Версія: **6**

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного/кількісного визначення антитіл до поверхневого Антигену Вірусу Гепатиту В у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для кількісного та якісного визначення антитіл до Поверхневого Антигену Вірусу Гепатиту В у плазмі та сироватці людини.

Тільки для діагностики «in vitro».

B. ВСТУП

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає гепатит В таким чином:

«Гепатит В - одне з найважливіших захворювань людства і є серйозною глобальною проблемою громадського здоров'я. Гепатит означає запалення печінки, і найчастішою причиною є зараження одним із 5 вірусів, які називаються гепатитами А, В, С, D і Е. Усі ці віруси можуть викликати гостре захворювання з симптомами, що тривають кілька тижнів, включаючи пожовтіння шкіри та очей (жовтяниця); темна сеча; сильна втома; нудота; блювота і біль у животі. Щоб знову відчувати себе у формі, може знадобитися від кількох місяців до року. Вірус гепатиту В може викликати хронічну інфекцію, при якій пацієнт ніколи не позбавляється від вірусу, а через багато років розвивається цироз печінки або рак печінки.

ВГВ є найсерйознішим типом вірусного гепатиту і єдиним типом, що викликає хронічний гепатит, від якого існує вакцина. Вірус гепатиту В передається при контакті з кров'ю або рідиною тіла інфікованої людини так само, як і вірус імунодефіциту людини (ВІЛ), вірус, що викликає СНІД. Однак, ВГВ у 50-100 разів більш інфекційний, ніж ВІЛ. Основними шляхами зараження ВГВ є: (а) перинатальний (від матері до дитини при народженні); (б) передача від дитини до дитини; (с) небезпечні ін'єкції та переливання; г) статевий контакт.

У всьому світі більшість інфекцій передається від інфікованої матері до дитини, від контакту дитини з дитиною в побутових умовах та від повторного використання нестерилізованих голівок та шприців. У багатьох країнах, що розвиваються, майже всі діти заражаються вірусом. У багатьох промислово розвинених країнах (наприклад, у Західній Європі та Північній Америці) характер передачі інший. У цих країнах передача від матері до дитини та від дитини до дитини становила до однієї третьої хронічних інфекцій до впровадження програм вакцинації проти дитячого гепатиту В. Однак, більшість інфекцій у цих країнах передається в молодому віці шляхом статевої активності та вживання ін'єкційних наркотиків. Крім того, вірус гепатиту В є основною інфекційною небезпечкою для медичних працівників, і більшість медичних працівників отримали вакцину проти гепатиту В.

Вірус гепатиту В не поширюється через заражену їжу або воду, і його неможливо поширити випадково на робочому місці. Високі показники хронічної інфекції ВГВ спостерігаються також у південних районах Східної та Центральної Європи. На Близькому Сході та в Індійському субконтиненті близько 5% хронічно інфіковані. Інфекція рідше зустрічається в Західній Європі та Північній Америці, де менше 1% хронічно інфіковані.

Маленькі діти, інфіковані ВГВ, мають найбільшу ймовірність розвитку хронічної інфекції. Приблизно у 90% немовлят, інфікованих протягом першого року життя, і від 30% до 50% дітей, інфікованих у віці від 1 до 4 років, розвивається хронічна інфекція. Ризик смерті від раку печінки або цирозу печінки, пов'язаного з ВГВ, становить приблизно 25% для осіб, які хронічно інфіковані в дитинстві.

Хронічний гепатит В у деяких пацієнтів лікується препаратами під назвою *інтерферон* або *ламівудин*. Пацієнтам з цирозом печінки іноді роблять трансплантацію печінки, але бувають різні наслідки. Краще попередити цю хворобу вакциною, ніж намагатися їївилікувати.

Вакцина проти гепатиту В має видатні показники безпеки та ефективності. З 1982 року у всьому світі було використано понад один мільярд доз вакцини проти гепатиту В. Вакцина вводиться у вигляді серії з трьох внутрішньом'язових доз. Дослідження показали, що вакцина на 95% ефективна для запобігання розвитку хронічної інфекції у дітей та дорослих, якщо вони ще не заражені. У багатьох країнах, де від 8% до 15% дітей раніше хронічно інфікувалися ВГВ, рівень хронічної інфекції знизився до менш, ніж 1% в імунізованих групах дітей. З 1991 року ВООЗ закликає всі країни додати вакцину проти гепатиту В у свої національні програми імунізації.»

Поверхневий антиген гепатиту В (HBsAg) є основним структурним поліпептидом оболонки вірусу гепатиту В (HBV). Цей антиген складається переважно з типової загальної детермінанти "а" та типоспецифічних детермінанти "d" та "у", присутніх лише на конкретних серотипах. Після зараження сильна імунологічна відповідь розвивається спочатку проти детермінанти специфічного типу, а потім - проти детермінанти «а». Проте визнано, що антитіла проти "а" є найбільш ефективними у нейтралізації вірусу, захищаючи пацієнта від інших інфекцій та призводячи його до одужання. Виявлення HBsAb стало важливим для спостереження за пацієнтами, інфікованими ВГВ, та моніторингу реципієнтів після вакцинації синтетичним та природним HBsAg.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті препаратом високоочищеного HBsAg, який при першій інкубації зі зразком специфічно захоплює антитіла проти HBsAg до твердої фази.

Після промивання захоплені антитіла виявляються за допомогою HBsAg, міченого пероксидазою (HRP), який специфічно зв'язує другий доступний для зв'язування сайт цих антитіл.

Фермент, специфічно зв'язаний із лунками, впливаючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, пропорційний кількості HBsAb у зразку і може бути виявлений ІФА зчитувачем.

Кількість антитіл можна оцінити за допомогою стандартної кривої, відкаліброваної за референсним препаратом ВООЗ.

Зразки попередньо обробляють у лунці розчинником для зразків, здатним блокувати інтерференцію, наявну у вакцинованих осіб.

D. КОМПОНЕНТИ

Кожен набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

1. Мікропланшет: MICROPLATE

12 смужок по 8 мікролунок, покриті очищеним термічно інактивованим HBsAg обох підтипів (ad і au) від людського походження та запечатані у пакет із осушувачем.

Дайте мікропланшету досягти кімнатної температури перед відкриттям; закрийте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при температурі 4 °C (°C).

2. Калібрувальна крива: CAL N° ...

5x2.0 мл (мл)/флакон. Кольорова та готова до використання стандартна крива, отримана з позитивної HBsAb плазми, титрованої за стандартом ВООЗ для анти-HBsAg (перший референсний препарат 1977, лот 17-2-77), діапазон: CAL1 = 0 мМО/мл (mIU/ml) // CAL2 = 10 мМО/мл (mIU/ml) // CAL3 = 50 мМО/мл (mIU/ml) // CAL4 = 100 мМО/мл (mIU/ml) // CAL 5 = 250 мМО/мл (mIU/ml). Містить білки сироватки людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) фосфатний буфер рН 7.4 +/- 0.1, 0.09% азид натрію та 0.045% ProClin 300 як консерванти. Стандарти синього кольору.

3. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X

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

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

4. Ферментний кон'югат: CONJ

1x 16.0 мл (мл)/флакон. Готовий до використання розчин червоного кольору.

Він містить інактивовані очищені HBsAg обох підтипів ad і au, мічений HRP, 5% BSA, 10 мМ (mM) трис-буфер рН 6.8 +/- 0.1, 0.3 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.

5. **Хромоген/Субстрат:** SUBS TMB
1 x 16 мл (мл)/флакон. Містить 50 мМ (мМ) буферний розчин цитрат-фосфату при рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетраметилбензидин (ТМБ) та 0.02% перекис водню (H₂O₂).
Примітка: Зберігати в захищеному від світла місці як чутливий до сильного освітлення.
6. **Сірчана кислота:** H2SO4 0.3 M
1x15 мл (мл)/пляшка. Містить 0.3 М (М) розчину H₂SO₄.
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363)
7. **Розчинник для зразка:** DILSPE
1x8 мл (мл). 10 мМ (мМ) Трис-буферний розчин рН 7.4 +/- 0.1, запропонований для використання у наступній вакцинації. Він містить 0.09% азиду натрію в якості консервантів.
8. **Контрольна сироватка:** CONTROL ...ml
1 флакон. Ліофілізована.
Містить протеїни сироватки ембріону теляти, антитіла людини до HBsAg, калібровані на 50 ± 10% ВООЗ мМО/мл (mIU/ml). 0.3 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.045% ProClin 300 в якості консервантів.
9. **Ущільнювальна фольга для планшета x 2 шт.**
10. **Вкладиш інструкції x 1 шт.**

Е. НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЯКІ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (100 мкл (μl) і 50 мкл (μl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу ЕІА (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 +/- 1 °С (°С)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування, настійно рекомендується).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

Ф. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Захищати Хромоген (ТМБ) від дії сильного світла та уникати вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °С (°С) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.

9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказує на будь-яку істотну втрату активності до 6 використань пристрою та терміном до 6 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до 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 ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Кров забирається асептичним 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 або 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 виїняті 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.
6. Зразки, концентрація антитіл до HBsAg яких очікується вище 250 мМО/мл (mIU/ml), слід розвести перед використанням або 1:10, або 1:100 у Калібраторі 0 мМО/мл (mIU/ml). Розведення слід проводити в чистих одноразових пробірках, розбавляючи 50 мкл (μl) кожного зразка 450 мкл (μl) Кал 0 (1:10). Потім 50 мкл (μl) розведення 1:10 розбавляють 450 мкл (μl) Кал 0 (1:100). Ретельно перемішайте пробірки у вортексі під час приготування розведених зразків.

Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

1. Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету досягнути кімнатної температури (близько 1 години).

Переконайтеся, що осушувач не набув зеленого кольору, 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). Після першого відкриття смужки, що залишилися, є стабільними, поки показник вологості всередині мішка з осушувачем не перетвориться з жовтого на зелений.

2. Калібрувальна крива:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

3. Контрольна сироватка:

Додайте до ліофілізованого порошку обсяг води марки ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.

Примітка: Контроль після розчинення не є стабільним. Зберігати замороженими в аліквотах при -20 °C (°C).

4. Концентрат буфера для промивання:

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

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

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

5. Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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

6. Розчинник зразка:

Готовий до використання. Добре перемішати на вортексі перед використанням.

7. Хромоген/Субстрат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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

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

8. Сірчана кислота:

Готова до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази:**

H315 - Викликає подразнення шкіри.

H319 - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази:**

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

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

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

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

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

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

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

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне незараження (70% етанол, 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 ±1 °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) пропускання 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, щоб відповідати значенням, наведеним у розділах «Перевірка 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 реактивні зразки, що призводить до хибно позитивних результатів. Використання автоматизованих робочих станцій ІФА рекомендується для скринінгу крові та коли кількість зразків, що підлягають тестуванню, перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Обслуговування клієнтів LABUA пропонує користувачеві підтримку в налаштуванні та перевірці інструментів, що використовуються в поєднанні з набором, для забезпечення повної відповідності описаним вимогам. Також, надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, 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 Контрольну Сироватку як описано вище.
5. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (близько 1 години), а потім перемішайте, як описано.
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 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.

У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

М. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

За бажанням клініциста за допомогою пристрою можна провести дві процедури.

М.1 Кількісний аналіз

1. Помістіть необхідну кількість смужок у тримач мікропланшетів. Залишіть лунки А1 і В1 порожніми для бланкування. Інші смужки зберігайте в пакеті з осушувачем при температурі 2.8 °C (°C), герметично закритими.

Потім додайте у всі лунки, які будуть використовуватися для тестування, за винятком А1 та В1, 50 мкл (μl) розчинника для зразків.

Важливе зауваження: Ця добавка додається перед розповсюдженням зразків і контролів у певні лунки і особливо призначена для блокування деяких речовин, присутніх у людей, які проходять вакцинацію та здатних маскувати антитіла.

2. Піпетуйте 100 мкл (μl) усіх Калібраторів, 100 мкл (μl) Контрольної сироватки у двох примірниках, а потім 100 мкл (μl) зразків. Контрольна сироватка використовується для перевірки того, що вся аналітична система працює належним чином. Перевірте, чи правильно додані калібратори, контрольна сироватка та зразки. Потім інкубуйте мікропланшет при температурі +37 °C (°C) протягом 60 хв.

Важливе зауваження: смужки слід заклеювати клейкою ущільнювальною фольгою лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не закривайте смужки під час використання автоматичних приладів ІФА.

3. Промийте мікропланшет як описано в розділі І.3.

4. У всі лунки, за винятком А1 та В1, піпетуйте 100 мкл (μl) ферментного кон'югату. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет при температурі +37 °C (°C) протягом 60 хвилин.

Важливі зауваження:

- 1) Будьте обережні, щоб не торкнутися до внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час дозування ферментного кон'югату. Можливе забруднення.
- 2) Перед використанням ретельно перемішайте Ферментний кон'югат на вортексі.

5. Промийте мікропланшет як описано.

6. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші ТМВ/Н₂О₂ у кожен лунку, включаючи бланк-лунки. Перевірте, чи правильно додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.

Важливе зауваження: Не піддавайте впливу сильного прямого світла, оскільки може утворитися сильний фон.

7. Зупиніть ферментативну реакцію, піпетуючи по 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у кожен лунку і використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на етапі 6. Потім виміряйте інтенсивність кольору за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язково), бланкуючи прилад в лунках А1 та В1.

М.2 Якісний аналіз

1. Помістіть необхідну кількість смужок у тримач мікропланшетів. Залишіть лунку А1 порожньою для бланкування. Інші смужки зберігайте в пакеті осушувачем при температурі 2.8 °C (°C), герметично закритими.
2. Додайте 50 мкл (μl) розчинника для зразків у всі лунки, за винятком лунки А1. Потім піпетуйте 100 мкл (μl) калібратора 0 мМО/мл (mIU/ml) у двох примірниках, 100 мкл (μl) калібратора 10 мМО/мл (mIU/ml) у двох примірниках, 100 мкл (μl) калібратора 250 мМО/мл (mIU/ml) разово, а потім 100 мкл (μl) зразків. Перевірте, чи правильно додані калібратори та зразки. Потім інкубуйте мікропланшет при температурі +37 °C (°C) протягом 60 хв.
3. Промити мікропланшет як вказано у розділі І.3.
4. У всі лунки, крім А1, піпетуйте 100 мкл (μl) ферментного кон'югату. Перевірте, чи правильно додано реагент. Інкубуйте мікропланшет при температурі +37 °C (°C) протягом 60 хвилин.

Важливі зауваження:

- 1) Будьте обережні, щоб не доторкнутися до внутрішньої поверхні лунки кінчиком піпетки під час дозування Ферментного кон'югату. Можливе забруднення.
- 2) Ретельно перемішайте Ферментний кон'югат на вортексі.

5. Промити мікропланшет як описано.

6. Піпетуйте 100 мкл (μl) суміші ТМВ/Н₂О₂ у кожен лунку, включаючи бланк- лунки. Перевірте, чи правильно додано реагент. Потім інкубуйте мікропланшет при кімнатній температурі протягом 20 хвилин.

Важливе зауваження: Не піддавайте впливу сильного прямого світла, оскільки може утворитися сильний фон.

7. Зупиніть ферментативну реакцію, піпетуючи по 100 мкл (μl) сірчаної кислоти у кожен лунку і використовуючи ту ж послідовність піпетування, що і на етапі 6. Потім виміряйте інтенсивність кольору за допомогою зчитувача мікропланшетів при 450 нм (nm) (зчитування) та при 620-630 нм (nm) (бланкування, обов'язково), бланкуючи прилад в лунках А1 та В1.

Важливі загальні зауваження:

1. Перед зчитуванням переконайтесь, що на дні мікролунки немає відбитків пальців. Відбитки пальців можуть давати хибнопозитивні результати при зчитуванні.
2. В ідеалі, зчитування слід проводити одразу після додавання стоп - розчину, але не пізніше ніж через 20 хвилин. Деяке самоокислення хромогену може призвести до більш високого фону.
3. Контрольна сироватка (CS) не впливає на розрахунок граничного значення (cut-off), а отже, і на розрахунок результатів тесту. Контрольну сироватку можна використовувати лише тоді, коли керівництво вимагає лабораторного внутрішнього контролю якості.

Н. СХЕМА АНАЛІЗУ (стандартна процедура)

Розчинник для зразка	50 мкл (μl)
Калібратори	100 мкл (μl)
Контрольна сироватка	100 мкл (μl)
Зразки	100 мкл (μl)
1-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочуванням АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (μl)
2-а інкубація	60 хв.
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочуванням АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н ₂ О ₂ суміш	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 розподілу у кількісних аналізах:

Мікропланшет

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

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

Нижче наведено приклад схеми розподілу у якісних аналізах:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11									
B	CAL1	S4	S12									
C	CAL1	S5	S13									
D	CAL2	S6	S14									
E	CAL2	S7	S15									
F	CAL5	S8	S16									
G	S1	S9	S17									
H	S2	S10	S18									

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

О. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Щоразу, коли використовується набір, проводиться перевірка на контролях, щоб перевірити настільки кваліфікована ефективність аналізу. Контролюйте відповідність наступних даних:

Параметри	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ 450 нм (nm)
Калібратор 0 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml)	< 0.200 ОЩ 450 нм (nm) після бланкування
Калібратор 10 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml)	ОЩ 450 нм (nm) вище, ніж ОЩ 450 нм (nm) Калібратора 0 мМО/мл (mIU/ml) + 0.100
Калібратор 250 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml)	> 1.500 ОЩ 450 нм (nm)
Контрольна сироватка	ОЩ 450 нм (nm) = ОЩ 450 нм (nm) CAL 50 мМО/мл (mIU/ml) ± 10%
Коефіцієнт варіації	< 30% для Калібратора 0 мМО/мл (mIU/ml)

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)	1. що розчин Хромогену/Субстрату не забруднився під час аналізу
Калібратор 0 мМО/мл (mIU/ml) >0.200 Коефіцієнт варіації > 30%	1. що процедура промивання та налаштування вошера є такими, як було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний належний миючий розчин і перед використанням вошер був ним заправлений; 3. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки під час дистрибуції стандартів; 4. що не відбулося забруднення Калібратора 0 мМО/мл (mIU/ml) або лунок, де він був доданий, 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 були заблоковані або частково перекриті.
Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml) ОЩ 450 нм (nm) < Cal 0 + 0.100	1. що процедура була проведена правильно. 2. що під час його дистрибуції не було допущено жодної помилки (наприклад: видача неправильного калібратора);

	3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими, як підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення стандарту.
Калібратор 250 мМО/мл (mIU/ml) <1.500 ОЩ 450 нм (nm)	1. що процедура була проведена правильно; 2. що під час дистрибуції не було допущено жодної помилки; 3. що процедура промивання та налаштування вошера є такими як, було підтверджено у попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. що не відбулося зовнішнього забруднення стандарту.
Контрольна сироватка Відрізняється від очікуваного значення	Спочатку перевірте, що: 1. процедура виконана правильно; 2. не допущено жодної помилки під час дистрибуції (напр.: внесення неправильного зразка); 3. процедура миття та налаштування вошера є правильними; 4. не відбулося зовнішнього забруднення стандарту; 5. Контрольна сироватка була розчинена з відповідним обсягом, зазначеним на етикетці. Якщо було вказано на помилку, аналіз слід повторити після усунення причини цієї помилки. Якщо помилки не виявлено, виконайте наведені нижче дії: a) отримано значення до +/- 20%: загальна точність лабораторії може не дозволити тесту відповідати очікуваному значенню +/- 10%. Повідомте про проблему керівнику для прийняття або відмови від цього результату. b) отримано значення вище +/- 20%: у такому випадку тест є недійсним, і слід звернутися в центр обслуговування LABUA.

Важливе зауваження:

Аналіз слід проводити так, як і на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 7.

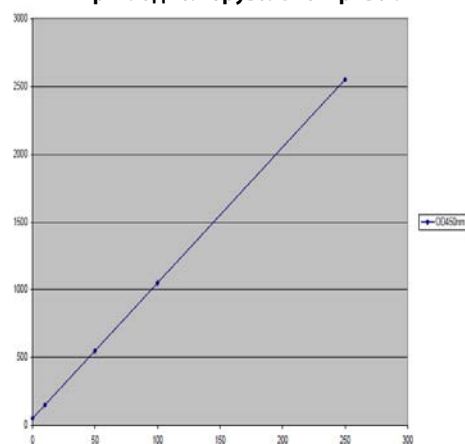
Р. РЕЗУЛЬТАТИ

Р1 Кількісний метод

Якщо тестування виявилось дійсним, використовуйте для кількісного методу затверджену програму підбору кривих, щоб намалювати калібрвальну криву зі значень, отриманих при зчитуванні при 450 нм (nm) (пропонується інтерполяція з 4 параметрами).

Потім по калібрвальній кривій обчислюють концентрацію антитіла до НВsAg у зразках. Приклад кривої калібрвання наведено на наступній сторінці.

Приклад калібрвальної кривої:



Важлива примітка:

Не використовуйте дану калібрвальну криву для розрахунків.

Р.2 Якісний метод

У якісному методі обчисліть середні значення ОЩ 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) для Калібраторів 0 та 10 мМО/мл (mIU/ml), а потім перевірте, чи правильний аналіз.

Приклад розрахунку (дані, отримані на етапі зчитування, описаному в розділі М, пункт 7).

Наступні дані не можна використовувати замість реальних цифр, отриманих користувачем.

Калібратор 0 мМО/мл (mIU/ml): 0.020 - 0.024 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.022 ОЩ 450 нм (nm)
Менше ніж 0.200 - Прийнято

Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml): 0.250 - 0.270 ОЩ 450 нм (nm)
Середнє значення: 0.260 ОЩ 450 нм (nm)
Вище ніж Кал 0 + 0.100 - Прийнято

Калібратор 250 мМО/мл (mIU/ml): 2.845 ОЩ 450 нм (nm)
Вище ніж 1.500 - Прийнято

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Згідно більшої частини міжнародної медичної літератури зразки з концентрацією нижче 10 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml) вважають негативними для антитіл до HBsAg.

Зразки з концентрацією, вищою за 10 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml), вважаються позитивними для антитіл до HBsAg.

Однак у процесі спостереження за реципієнтами вакцинації, значення 20 ВООЗ мМО/мл (mIU/ml) зазвичай приймається в медичній літературі, як мінімальна концентрація, при якій пацієнт вважається клінічно захищеним від інфекції ВГВ.

Важливі примітки:

1. Інтерпретацію результатів слід проводити під наглядом лабораторного керівника, щоб зменшити ризик помилок при оцінці та неправильного тлумачення.
2. Коли результати тестування передаються з лабораторії в інший заклад, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Встановлювати і передавати пацієнту діагноз повинен відповідний кваліфікований лікар.

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка ефективності 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

Межа виявлення аналізу була розрахована за допомогою міжнародного препарату HBsAb, який постачається CLB за дорученням ВООЗ (перший референсний препарат 1977, лот 17-2-77), на якому калібрувалася калібрвальна крива. В якості розчинника використовували негативну сироватку ВГВ, як рекомендував постачальник. Результати контролю якості наведені в наступній таблиці:

ВООЗ мМО/мл (mIU/ml)	SAB.CE Лот 1002	SAB.CE Лот 1001	SAB.CE Лот 1002/2
50	0.933	0.812	0.846
10	0.219	0.192	0.194
5	0.110	0.096	0.104
2.5	0.057	0.058	0.067
Стд. 0	0.021	0.015	0.023

2. ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

2.1 Діагностична специфічність:

Визначається як ймовірність аналізу негативної оцінки за відсутності конкретного аналізу.

Понад 500 негативних зразків були протестовані внутрішньо та зовнішньо проти європейської компанії.

Діагностична специфічність становила 98.8%.

Більш того, діагностичну специфічність оцінювали шляхом тестування 113 потенційно інтерферуючих зразків (інші інфекційні захворювання, пацієнти, які страждають невірусними захворюваннями печінки, пацієнти на діалізі, вагітні жінки, гемолізовані, ліпемічні та ін.) проти європейської компанії. Значення специфічності становило 100%. Нарешті, для визначення специфічності була використана як людська плазма, отримана за допомогою різних стандартних методів (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватки людини. Жодної хибної реакційної здатності через метод приготування зразків не спостерігалось.

2.2 Діагностична чутливість:

Визначається як ймовірність аналізу позитивної оцінки в присутності конкретного аналізу.

Оцінено 106 вакцинованих пацієнтів з діагностичною чутливістю 100%. Більше 100 пацієнтів, заражених вірусом гепатиту В, пройшли внутрішнє та зовнішнє тестування проти європейської компанії; діагностична чутливість становила 100%.

3. ТОЧНІСТЬ:

Нижче наведено середні значення, отримані в результаті дослідження, проведеного на трьох зразках різної реактивності анти-HBsAg, досліджених у 16 повторях у трьох окремих аналізах:

SAB.CE: лот 1202

Калібратор 0 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.038	0.038	0.039	0.039
СВ	0.003	0.004	0.005	0.004
КВ%	8.8	9.5	11.8	10.0

Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.250	0.243	0.244	0.246
СВ	0.020	0.023	0.017	0.020
КВ%	8.0	9.3	7.0	8.1

Калібратор 250 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	2.998	3.000	3.259	3.085
СВ	0.152	0.151	0.158	0.153
КВ%	5.1	5.0	4.8	5.0

SAB.CE: лот 1002

Калібратор 0 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.048	0.048	0.050	0.049
СВ	0.005	0.004	0.006	0.005
КВ%	9.4	8.4	11.5	9.8

Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.249	0.252	0.242	0.248
СВ	0.021	0.020	0.023	0.021
КВ%	8.3	7.9	9.6	8.6

Калібратор 250 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	3.544	3.653	3.612	3.603
СВ	0.153	0.176	0.138	0.156
КВ%	4.3	4.8	3.8	4.3

SAB.CE: лот 1002/2

Калібратор 0 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.050	0.051	0.050	0.050
СВ	0.005	0.006	0.006	0.005
КВ%	10.0	10.9	11.9	10.9

Калібратор 10 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	0.226	0.238	0.239	0.234
СВ	0.015	0.017	0.018	0.016
КВ%	6.5	7.0	7.5	7.0

Калібратор 250 мМО/мл (mIU/ml) (к-сть = 16)

Середні величини	1 пробіг	2 пробіг	3 пробіг	Середнє значення
ОЩ 450 нм (nm)	3.526	3.457	3.499	3.494
CV	0.137	0.143	0.162	0.147
KB%	3.9	4.1	4.6	4.2

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

4. ДОСТОВІРНІСТЬ

Достовірність аналізу перевіряли тестами на розведення та відновлення. Будь-який «хук-ефект», недооцінка якого, ймовірно, відбудеться у високих дозах аналіту, був виключений до 10 000 мМО/мл (mIU/ml).

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі зчитування, описаному в розділі M, пункт 7.

S. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

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

Цей тест підходить тільки для тестування окремих 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.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки якості. 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