НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО ВІРУСУ ПРОСТОГО ГЕРПЕСУ 1 ТИПУ

HSV1 IgM

Кат. № : ***HSV1M.CE*** *Дата випуску інструкції:* ***12-2019***
Версія: ***4***

Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

Імуноферментний аналіз (ІФА) «Захоплення» для визначення антитіл IgM до Вірусу Простого Герпесу типу 1 у плазмі та сироватці людини

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для визначення антитіл IgM до Вірусу Простого Герпесу типу 1 у плазмі та сироватці людини із системою «захоплення». Пристрій призначений для спостереження за пацієнтами, інфікованими HSV1, та для моніторингу ризику неонатальних вад через інфекцію HSV під час вагітності.
Тільки для діагностики *in vitro*.

B. ВСТУП

Вірус Простого Герпесу типу 1 (HSV1) і типу 2 (HSV2) є великими складними ДНК-вмісними вірусами, які, як було показано, індукують синтез кількох білків під час інфекції, мають велику кількість перехресних детермінант і лише кілька типоспецифічних послідовностей.
Більшість первинних і рецидивних генітальних герпетичних інфекцій спричинені HSV2; в той час як не генітальні інфекції, такі як герпес, викликані переважно HSV1.
Виявлення специфічних до вірусу антитіл IgG та IgM має важливе значення для діагностики гострих/первинних вірусних інфекцій або реактивації прихованої інфекції за відсутності явних клінічних симптомів. Безсимптомні інфекції можуть виникати при HSV у нечебто здорових осіб та під час вагітності. Важкі герпетичні інфекції можуть виникнути у пацієнтів з ослабленим імунітетом і пригніченим імунітетом, у яких хвороба може перерости в критичні патології.
Визначення специфічних антитіл до HSV стало важливим для моніторингу пацієнтів із «ризиком» та для спостереження за гострими та важкими інфекціями.

C. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Аналіз заснований на принципі «захоплення IgM», коли антитіла класу IgM у зразку спочатку захоплюються твердою фазою, покритою антитілами анти-hIgM.
Після вимивання всіх інших компонентів зразка і, зокрема, антитіл IgG, специфічні IgM, захоплені на твердій фазі, виявляють шляхом додавання препарату інактивованого HSV1, міченого HSV1-специфічним антитілом, кон'югованим з пероксидазою (HRP).
Після інкубації мікролунки 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 HSV1, присутніх у зразку.
У системі описано, як контролювати, чи є позитивний результат, показаний зразком, правдивим чи ні (Підтверджувальний тест), що допомагає клініцисту правильно інтерпретувати результати.

D. КОМПОНЕНТИ

Набір містить реагентів для виконання 96 тестів.

1. **Мікропланшет:** *MICROPLATE*
   12 смужок х 8 відривних лунок, покритих афінно очищеними козячими антитілами проти IgM людини, у присутності бичачих білків.
   Пластини запечатані в пакет з осушувачем.
   Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури; повторно запечатайте невикористані смужки в пакеті з осушувачем і зберігайте при 2-8 °C (°C).

2. **Негативний контроль:** *CONTROL -*
   1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить 1% білків сироватки людини, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.
   Негативний контроль має блідо-жовтий колір.

3. **Позитивний контроль:** *CONTROL +*
   1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання контроль. Містить 1% сироватки людини, позитивної на IgM HSV1, 2% казеїну, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.
   Негативний контроль кодується зеленим кольором.

4. **Калібратор:** *CAL ….*
   X1 флакон. Ліофілізований реагент розчиняють водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить анти HSV1 IgM, фетальну бичачу сироватку, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцин сульфату та 0.045% ProClin 300 як консерванти.
   Примітка: Об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакона, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний об'єм, зазначений на етикетці.

5. **Ліофілізований HSV1 Ag:** *AG HSV1*
   x6 ліофілізованих флаконів. Флакони містять інактивований гамма-променями HSV1 у білковому буфері. Розчин містить 2% білків великої рогатої худоби, 10 мМ (mM) буфера Tris HCl pH 6.8+/-0.1, 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину та 0.045% ProClin 300. Розвести з 1.9 мл (ml) Розчинника антигену, як зазначено у спеціальному розділі.

6. **Концентрат промивного буфера:** *WASHBUF 20X*
   1x60 мл/пляшка (ml/bottle). 20X концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатний буфер, pH 7.0 +/- 0.2, 0.05% Tween 20 та 0.045% ProClin 300.

7. **Ферментний кон'югат:** *CONJ*
   1x0.8 мл/флакон (ml/vial). 20x концентрований розчин HSV1-специфічного антитіла, міченого HRP і розведеного в білковому буфері, що містить 10 мМ (mM) Tris-буфера pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.2 мг/мл (mg/ml) сульфату гентаміцину як консерванти.

8. **Розчинник антигену:** *AG DIL*
   1x16 мл/флакон (ml/vial). Білковий буферний розчин для приготування імунокомплексу. Розчин містить 10 мМ (mM) Tris-буфера pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 і 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцин сульфату як консерванти. Реагент кодований 0.01% червоного харчового барвника.

9. **Розчинник для зразків:** *DILSPE*
   2x60 мл/флакон (ml/vial). Протеїновий буферний розчин для розведення зразків. Містить 2% казеїну, 10 мМ (mM) Tris-буфер pH 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.
   Реагент кодований 0.01% синього харчового барвника.

10. **Хромоген/Субстрат:** *SUBS TMB*
    1x16 мл/флакон (ml/vial). Містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатний буферний розчин, pH 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксиду, 0.03% тетраметил-бензидину (або TMB) та 0.02% перекису водню (H_2O_2).
    Примітка: Зберігати захищеним від світла через чутливість до сильного освітлення.

11. **Сірчана кислота:** *H_2SO_4 O.3 M (M)*
    1x15 мл/флакон (ml/vial). Містить розчин 0.3 M (M) H_2SO_4.
    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.**

Перекладач Тетяна Зеленська

E. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (100 мкл (µl), 100 мкл (µl) та 10 мкл (µl)) та одноразові пластикові наконечники.
2. Вода класу EIA (бідистильована або деіонізована, деревне вугілля, оброблене для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
3. Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
4. Абсорбуючі паперові серветки.
5. Відкалібрований термостатичний інкубатор для мікропланшетів ІФА (сухий або вологий), встановлений на +37 °C (°C) (допуск +/-0.5 °C (°C)).
6. Калібрований мікропланшетний зчитувач ІФА з фільтрами 450 нм (nm) (зчитування) та з 620-630 нм (nm) (бланкування).
7. Калібрований мікропланшетний вошер ІФА.
8. Вортекс або подібні змішувальні інструменти.

F. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути 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. Захищайте Хромоген (TMB) від сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенда, де проводиться тест.
5. Отримавши набір, зберігайте його 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 міняли місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до шести 6 використань пристрою терміном до 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв.
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразнюючою. 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. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування, коли набір використовується для скринінгу одиниць крові.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важкі частинки або мікробні нитки та тіла, слід викинути, оскільки вони можуть привести до помилкових результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2-8 °C (°C) у пробірках для первинного збору протягом п'яти днів після збору.
   Не заморожуйте первинні пробірки для збору. Для більш тривалого періоду зберігання зразки сироватки та плазми, обережно вийняті з первинної пробірки, можна зберігати замороженими при -20 °C (°C) принаймні 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо є частинки, центрифугувати при 2000 об/хв (rpm) протягом 20 хвилин або фільтрувати за допомогою фільтрів 0.2-0.8 мкм (µ), щоб очистити зразок для тестування.

H. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

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

Мікропланшети:

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 Dia.Pro.
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 змінює колір 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 ліофілізованого порошку об'єм води класу ІФА, зазначений на етикетці; дайте повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.
Примітка: *Розчинений калібратор не стабільний. Зберігати в замороженому вигляді в аліквотах при -20 °C (°C).*

Концентрат Промивного буфера:

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

Перекладач Тетяна Зеленська

Ag/Ab імунокомплекс:
Дійте обережно наступним чином:

1. Розчиніть вміст ліофілізованого флакона з 1.9 мл (ml) Розчинника кон'югату/антигена. Дайте ліофілізованому вмісту повністю розчинитися, а потім обережно перемішайте на вортексі.
2. Обережно перемішайте концентрований Ферментний кон'югат на вортексі. Потім додайте 0.1 мл (ml) його у флакон з розчиненим HSV1 Ag і обережно перемішайте на вортексі.

Важливі примітки:

1. *Розчиніть і приготуйте лише кількість флаконів, необхідну для тесту. Отриманий Імунокомплекс не стабільний. Зберігайте будь-який залишковий розчин у замороженому вигляді в аліквотах при -20 ℃ (℃).*
2. *Приготування Імунокомплексу має бути виконано **безпосередньо перед** внесенням зразків і контролів у планшет. Знову обережно перемішайте на вортексі безпосередньо перед використанням.*

Розчинник зразка:
Готовий до використання. Перед використанням ретельно перемішайте на вортексі.

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: звернiться 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: звернiться за медичною консультацією/допомогою.*
***P362+P363** - Зніміть забруднений одяг і виперіть його перед повторним використанням.*

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

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та достовірність +/- 2%.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (℃) (допуск +/- 0.5 °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 інтенсивно 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/лунку (µl/well) 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, щоб відповідати значенням, наведеним 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 обробки рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена, приділяючи особливу увагу, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для видачі зразків та промивання. Ефект перенесення повинен бути вивчений і контрольований, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за пробіг.
7. Служба підтримки клієнтів Dia.Pro пропонує підтримку користувачеві в налаштуванні та перевірці приладів, що використовуються в поєднанні з набором, з метою забезпечення відповідності описаним вимогам. Також надається підтримка для встановлення нових інструментів, які будуть використовуватися з набором.

L. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовувати, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтесь, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Переконайтеся, що Хромоген/Субстрат безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи його невеликий об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломок і не пролито рідини всередині коробки (основний контейнер). Переконайтесь, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
3. Розведіть весь вміст 20х концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
4. Розчиніть вміст Калібратора, як описано вище та 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 (℃) 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.

Перекладач Тетяна Зеленська

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 Автоматичний аналіз:

Якщо тест виконується автоматично за допомогою системи ІФА, ми пропонуємо налаштувати прилад на аспірацію 1000 мкл (µl) Розчинника зразка, а потім 10 мкл (µl) зразка (коефіцієнт розведення 1:101). Весь вміст потім внести у правильно визначену пробірку для розведення. Перед аспірацією наступного зразка голки необхідно належним чином промити, щоб уникнути перехресного забруднення між зразками. Коли всі зразки будуть розведені, налаштуйте прилад на аспірацію 100 мкл (µl) зразків у відповідні лунки мікропланшета.

Цю процедуру можна проводити також у два етапи розведень 1:10 кожне (90 мкл (µl) Розчинника зразка + 10 мкл (µl) Зразка) у другу платформу для розведення. Потім налаштуйте прилад на аспірацію спочатку 100 мкл (µl) Розчинника зразка, потім 10 мкл (µl) рідини з першого розведення на платформі і, нарешті, дозувати весь вміст у відповідну лунку мікропланшета для аналізу.

Не розбавляйте контролі/калібратор, оскільки вони готові до використання.

Внесіть 100 мкл (µl) калібраторів/контролів у відповідні калібрувальні/контрольні лунки.

Для наступних операцій дотримуйтесь інструкцій, наведених нижче для ручного аналізу.

Настійно рекомендується переконатися, що проміжок часу між подачею першої та останньої проби буде розраховано приладом і враховано, відповідно відстрочивши першу операцію промивання.

M.2 Ручний аналіз:

1. Розведіть зразки 1:101, внесенням спочатку 10 мкл (µl) зразка, а потім 1 мл (µl) Розчинника зразка в пробірку для розведення; обережно перемішати на вортексі.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залиште лунку A1 порожньою для операції бланкування.
3. Внесіть 100 мкл (µl) Негативного Контролю та 100 мкл (µl) Калібратора у відповідні лунки в двох примірниках. Внесіть 100 мкл (µl) Позитивного Контролю в одному примірнику у відповідну лунку. Не розбавляйте контролі 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 контролі та калібратор внесені.
5. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при + 37 °C (°C).**

Важливе зауваження: *Смужки повинні бути заклеєні клейкою ущільнювальною фольгою, що постачається з набором, лише тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки, використовуючи автоматичні прилади ІФА.*

6. Промийте мікропланшет з використанням автоматичного вошера, як описано раніше (розділ I.3).
7. Піпетуйте 100 мкл (µl) **Імунокомплексу Ag/Ab** в кожну лунку, окрім лунки A1 для бланкування і закрийте плівкою. Перевірте, чи цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, окрім лунки A1.

Важлива примітка: *Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим* ***Імунокомплексом Ag/Ab****. Може відбутися забруднення.*

8. Інкубуйте мікропланшет протягом **60 хвилин при +37 °C (°C).**
9. Промийте мікролунки, як описано в кроці 6.
10. У кожну лунку внесіть піпеткою 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат, включаючи лунку для бланкування. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24 °C (°C)) протягом 20 хвилин.**

Важливе зауваження: *Не піддавайте сильному прямому освітленню. Можливо, буде створено високий фон.*

11. Піпетуйте 100 мкл (µl) Сірчаної кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію, у всі лунки, використовуючи ту ж послідовність піпетування, що й на етапі 10. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки з синього на жовтий.
12. Виміряйте інтенсивність забарвлення розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, використовуючи 450 нм (nm) фільтр (зчитування) та 620-630 нм (nm) фільтр (віднімання фону, обов'язкове), бланкуючи прилад на A1.

Важливі загальні 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.*

N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	**Операції**
Калібратор(*) та Контролі Зразки розведені 1:101	100 мкл (µl) 100 мкл (µl)
1-а інкубація	**60 хвилин**
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Імунокомплекс	100 мкл (µl)
2-а інкубація	**60 хвилин**
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
TMB/H_2O_2	100 мкл (µl)
3-я інкубація	**20 хвилин**
Температура	кімнатна
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm)/620-630 нм (nm)

(*) Важливі примітки:

- *Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-Off, тому він не впливає на обчислення результатів тесту.*
- *Калібратор (CAL) використовується тільки в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.*

Нижче наведено приклад схеми розподілу:

Мікропланшет

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3										
B	NC	S 4										
C	NC	S 5										
D	CAL(*)	S 6										
E	CAL(*)	S 7										
F	PC	S 8										
G	S 1	S 9										
H	S 2	S 10										

Легенда: BLK = Бланк NC = Негативний контроль PC = Позитивний контроль S = Зразок CAL(*) = Калібратор – не обов'язково

O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації проводиться на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням.

Переконайтеся, що такі дані збігаються:

Параметри	**Вимоги**
Бланк-лунка	< 0.05 значення OD450 нм (nm)
Середнє значення Негативного контролю (NC)	< 0.200 значення OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%
Позитивний контроль	> 1.000 OD450 нм (nm)

Перекладач Тетяна Зеленська

Якщо результати тесту відповідають вимогам, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.
Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі і виконайте такі перевірки:

Проблема	Перевірити
Бланк-лунка > 0.05 OD450 нм (nm)	1. чи розчин Хромоген/Субстрат не був забруднений під час аналізу
Негативний контроль (NC) > 0.200 OD450 нм (nm) після бланкування коефіцієнт варіації > 30%	1. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в рамках попереднього кваліфікаційного дослідження; 2. чи використовується відповідний миючий розчин, а перед використанням вошер був ним праймований; 3. чи в процедурі аналізу не було допущено помилки (внесення позитивного контролю замість негативного); 4. чи не відбулось забруднення негативного контролю або лунок, де розподіл був здійснений, через розливання позитивних зразків або кон'югату; 5. чи мікропіпетки не забруднені позитивними зразками або кон'югатом; 6. чи голки вошера не були заблоковані або частково перекриті.
Позитивний контроль <1.000 OD450 нм (nm)	1. чи процедура була правильно виконана; 2. що жодної помилки не було зроблено в розподілі контролів (видача негативного контролю замість позитивного контролю. У цьому випадку негативний контроль також матиме значення OD450 нм (nm) > 0.150; 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення позитивного контролю.

Якщо такі проблеми виникають, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

**** Примітка:**
Аналіз слід виконувати, як крок читання, описаний у розділі M, пункт 12.

Якщо використовувалася Калібратор, перевірте такі дані:

Проблема	Перевірити
Калібратор	S/Co > 1.2

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, дійте наступним чином:

Проблема	Перевірити
Калібратор S/Co < 1.2	1. чи процедура була правильно виконана; 2. чи під час внесення не сталася помилка (внесення неправильного контролю); 3. чи процедура промивання та налаштування вошера підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 4. чи не відбулося зовнішнього забруднення калібратора.

У будь-якому випадку, якщо всі інші параметри (Бланк, Негативний Контроль, Позитивний Контроль) відповідають встановленим вимогам, тест можна вважати дійсним.

P. РЕЗУЛЬТАТИ
Результати тесту розраховуються на основі середнього значення OD450 нм (nm)/620-630 нм (nm) Негативного Контролю (NC) за допомогою граничного значення (Co), визначеного за такою формулою:

Cut-Off = NC + 0.250

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

Важлива примітка: *Коли розрахунок результатів виконується операційною системою автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для розрахунку граничного значення та правильної інтерпретації результатів використовується правильна формула.*

Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ
Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення OD 450 нм (nm)/620-630 нм (nm) зразка і граничного значення Cut-off (Co), або S/Co, відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 1.0	Негативний
1.0 – 1.2	Двозначний
> 1.2	Позитивний

Негативний результат свідчить про те, що пацієнт на даний час не переносить гостру інфекцію Вірусу Простого Герпесу 1 типу.
Будь-якого пацієнта, який показує неоднозначний результат, слід повторно перевірити, дослідивши другий зразок, взятий у пацієнта через 1-2 тижні після першого дослідження.
Позитивний результат свідчить про інфекцію Вірусом Простого Герпесу 1 типу.

Нижче наведено приклад розрахунку (дані, отримані як етап читання, описаний у розділі M, пункт 12).

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

Негативний контроль: *0.100 – 0.120 – 0.080 OD450 нм (nm)*
Середнє значення: *0.100 OD450 нм (nm)*
Нижче 0.150 – *Приймається*

Позитивний контроль: *1.850 OD450 нм (nm)*
Більше 1.000 – *Приймається*

Cut-off *= 0.110+0.250 = 0.360*

Калібратор: *1.000 – 0.900 OD450 нм (nm)*
Середнє значення: *0.950 OD450 нм (nm)* *S/Co=2.6*
S/Co вище 1.2 – *Приймається*

Зразок 1: *0.075OD450 нм (nm)*
Зразок 2: *1.580 OD450 нм (nm)*
Зразок 1 S/Co < 1.0 *= негативний*
Зразок 2 S/Co > 1.2 *= позитивний*

Важливі примітки:
1. *Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.*
2. *Особливу увагу при інтерпретації результатів слід приділяти під час спостереження за вагітністю щодо інфекції HSV через ризик тяжких вад неонатального розвитку.*
3. *Під час моніторингу вагітності настійно рекомендується підтверджувати будь-який позитивний результат спочатку за допомогою процедури, описаної нижче, а по-друге, за допомогою іншого пристрою для виявлення HSV IgM, перш ніж вживати будь-яких профілактичних медичних заходів.*
4. *Будь-який позитивний зразок повинен бути представлений на Тест Підтвердження, зазначений у розділі T, перш ніж давати позитивний результат. За допомогою цього тесту можна виявити, а потім виключити помилкові реакції, що призводять до неправильної інтерпретації аналітичного результату.*
5. *Коли результати випробувань передаються з лабораторії до іншого відділення, слід звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.*

6. *Діагноз повинен поставлений і переданий пацієнту лікарем з відповідною кваліфікацією.*

R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Межа виявлення

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл HSV1 і 2 IgM.

За його відсутності визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), відкалібрований на препараті під назвою «Accurun – Anti HSV2 IgM плазма» виробництва Boston Biomedica Inc., США, код 9106072, щоб забезпечити пристрій постійною і відмінною чутливістю.

Тому межа виявлення аналізу була розрахована на IGS. Криву граничного розведення готували в Негативному Контролі (NC).

Результати Контролю Якості наведені в наступній таблиці:

Значення OD450 нм (nm)

IGS	HSV1M.CE Лот № RD1	HSV1M.CE Лот № RD2	HSV1M.CE Лот № RD3
1 X	0.450	0.460	0.455
2 X	0.277	0.300	0.288
4 X	0.216	0.198	0.185
NC	0.115	0.085	0.086

2. Діагностична Чутливість

Діагностична чутливість була перевірена в дослідженні оцінки ефективності на панелях з 40 зразків, які класифікувалися як позитивні з набором, маркованим CE. Значення, отримане при аналізі, становило > 98%.

3. Діагностична специфічність

Діагностична специфічність була визначена під час оцінки ефективності на панелях з понад 300 зразків, негативних з референсним набором, отриманих від нормальних осіб європейського походження.

Для визначення специфічності використовували як плазму, отриману за допомогою різних стандартних методів приготування (цитрат, ЕДТА та гепарин), так і сироватку. Жодної помилкової реактивності через метод приготування зразка не спостерігалося.

Заморожені зразки також були перевірені, щоб визначити, чи не впливає це на результати тесту. На чистих зразках і зразках без частинок ніяких інтерференцій не спостерігалося.

Дослідження, проведене на більш ніж 60 потенційно перехресно реактивних зразках, не виявило жодних інтерференцій у системі.

Перехресної реакції не спостерігалося.

Оцінка ефективності надала значення > 98%.

Хибнопозитивні реакції все одно можна виділити, а потім виключити при інтерпретації результатів за допомогою процедури, описаної в розділі T, щоб перевірити, чи є позитивний результат реальним.

4. Точність

Результати повідомляються таким чином:

HSV1M.CE Лот № RD1

Негативний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.083	0.107	0.116	0.102
Стандартне відхилення	0.004	0.017	0.013	0.011
CV%	5.12	15.82	11.59	10.84

Низько реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.393	0.436	0.421	0.417
Стандартне відхилення	0.031	0.019	0.007	0.019
CV%	7.93	4.38	1.68	4.66

Високо реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	1.469	1.530	1.541	1.513
Стандартне відхилення	0.034	0.055	0.037	0.042
CV%	2.31	3.60	2.39	2.77

HSV1M.CE Лот № RD2

Негативний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.101	0.099	0.097	0.099
Стандартне відхилення	0.009	0.011	0.013	0.011
CV%	8.91	11.11	13.40	11.14

Низько реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.412	0.395	0.420	0.409
Стандартне відхилення	0.015	0.009	0.012	0.012
CV%	3.64	2.27	2.86	2.92

Високо реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	1.512	1.498	1.534	1.515
Стандартне відхилення	0.042	0.035	0.028	0.035
CV%	2.78	2.34	1.83	2.31

HSV1M.CE Лот № RD3

Негативний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.095	0.112	0.092	0.100
Стандартне відхилення	0.012	0.009	0.010	0.011
CV%	12.6	8.04	10.86	10.50

Низько реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	0.405	0.398	0.412	0.405
Стандартне відхилення	0.012	0.015	0.014	0.014
CV%	2.96	3.77	3.40	3.37

Високо реактивний (N=16)

Середні значення	1-й пробіг	2-й пробіг	3-й пробіг	Отримане середнє
OD 450 нм (nm)	1.489	1.475	1.518	1.494
Стандартне відхилення	0.025	0.032	0.028	0.028
CV%	1.68	2.17	1.84	1.90

Важлива примітка:

Дані про продуктивність були отримані на етапі читання, описаному в розділі M, пункт 12.

S. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після відтавання, можуть давати деякі помилкові результати.

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

Цей тест підходить лише для тестування окремих зразків, а не пулованих.

Діагноз інфекційного захворювання не слід встановлювати на підставі одного результату дослідження. Необхідно враховувати клінічний анамнез пацієнта, його симптоматику, а також інші діагностичні дані.

T. ТЕСТ ПІДТВЕРДЖЕННЯ

Щоб забезпечити лікаря з найкращою точністю спостереження за вагітністю, коли хибнопозитивний результат може призвести до операції аборту, проводиться Тест Підтвердження. Тест Підтвердження має бути проведений на будь-якому позитивному зразку, перш ніж діагноз первинної інфекції HSV буде передано лікарю.

Виконайте для підтвердження наступним чином:

1. Приготуйте Комплекс Антиген/Кон'югат, як описано у відповідному розділі. Цей реагент називається Розчином A.
2. Потім 25 мкл (µl) концентрованого Ферментного Кон'югату розводять у 500 мкл (µl) Розчинника антигену та обережно перемішують на вортексі. Не використовуйте для цієї процедури

флакон з ліофілізованим антигеном! Цей розчин називається Розчином B.
3. Лунку A1 смужки залишають порожньою для бланкування.
4. Негативний Контроль вноситься в смужку в положеннях B1+C1. Це використовується для розрахунку значень Cut-off та S/Co.
5. Позитивний зразок, що підлягає підтвердженню, розведений 1:101, вноситься в смужку в положенні D1+E1.
6. Смужку інкубують 60 хвилин при +37 °C (°C).
7. Після промивання лунку A1 для бланкування залишають порожньою.
8. 100 мкл (µl) Розчину A вносять у лунки B1+C1+D1.
9. Потім 100 мкл (µl) Розчину B додають у лунку E1.
10. Смужку інкубують 60 хвилин при +37 °C (°C).
11. Після промивання до всіх лунок додають 100 мкл (µl) Хромогену/Субстрату і смужку інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.
12. У всі лунки додають 100 мкл (µl) Сірчаної Кислоти, а потім вимірюють їх інтенсивність кольору при 450 нм (nm) (фільтр для зчитування) і 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, виникла проблема розподілу або забруднення під час першого випробування. Процедуру аналізу в розділі M необхідно повторити, щоб перевірити аналіз.
2. Якщо зразок у позиції D1 показує значення S/Co вище 1.2, а в позиції E1 показує значення S/Co, що все ще вище 1.2, зразок вважається **хибнопозитивним**. Реакційна здатність зразка фактично не залежить від специфічної присутності HSV1, і відбулася перехресна реакція з ферментним кон'югатом.
3. Якщо зразок у позиції D1 показує значення S/Co вище 1.2, а в позиції E1 показує значення S/Co нижче 1.0, зразок вважається **дійсно позитивним**. Реакційна здатність зразка фактично залежить від конкретної присутності HSV, а не через будь-яку перехресну реакцію.

Наведена нижче таблиця для інтерпретації результатів

Лунка		**S/Co**	
D1	< 1.0	> 1.2	> 1.2
E1	< 1.0	> 1.2	< 1.0
Інтерпретація	Проблема з забрудненням	Хибнопозитивний	Дійсно позитивний

ЛІТЕРАТУРА

1. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunochemistry 8: 871-874, 1971.
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol.. 109: 129-135, 1971.
3. Remington J.S. and Klein J.O.. (1996) In "Infectious diseases of fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A. (1982) In "essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B. Lippincott Co. Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Leinikki P.O. et al.. J.Clin.Microbiol.. 8:418, 1978.
6. Piroid E. et al.. Révue Méd.Vet.. 131:25, 1980.
7. Vaheri A. et al.. J.Med.Virol.. 5:171, 1980.
8. Vejtorp M. et al.. Acta Path.Microbiol.Scand.. 88:349, 1980.
9. Voller A. et al.. Brit.J.Exp.Pathol.. 56:338, 1975.

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю відповідно до правила EN ISO 13485. Кожна партія піддається контролю якості та випускається на ринок лише за умови, що вона відповідає технічним специфікаціям ЄС та критеріям прийнятності.

ВИРОБНИК

DIA.PRO
Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy
Phone +39 02 27007161
Fax +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

ТОВ ДІА.ПРО
Діагностік Біопробс s.r.l.
вул. Г. Кардуччі, 27
20099 Сесто Сан Джованні
Мілан (MI) Італія
тел.: +39 02 2700 7161
факс: +39 02 44386771
e-mail: info@diapro.it

УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua