

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «Био-Рад Лаборатории»



Директор Е.В.

09» *редакт* 2010 г.

**Инструкция по применению изделия медицинского
назначения**

**«Тест-системы диагностические «Монолиза» (Monolisa)
для выявления маркеров гепатита А в сыворотке и плазме
крови человека.»**

2010

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	3
2. ПРИНЦИП ТЕСТА	3
3. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА	3
4. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ	4
5. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ	4
6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
7. ОБРАЗЦЫ	6
8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ - СРОК ГОДНОСТИ - УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ	6
11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА	7
10. АДАПТАЦИЯ СИСТЕМЫ	8
11. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ: -КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ	9
12. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ: -КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД	10
13. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ (ОПЦИЯ)	11
14. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА	12
15. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА	13
16. ЛИТЕРАТУРА	13

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Монолизат® Общие Анти-ВГА Плюс – набор для иммуноферментного анализа для выявления и количественного определения общих анти-ВГА антител в сыворотке или плазме крови человека. Набор может быть использован при диагностике рецидивирующей и первичной инфекции вирусом гепатита А (ВГА).

Набор также может быть использован для определения иммунного статуса до вакцинации и оценки защиты против ВГА после вакцинации.

После вакцинации против ВГА анти-ВГА антитела могут быть обнаружены через 2 недели и затем обычно в течение нескольких лет.

Определение уровня общих анти-ВГА антител было стандартизовано с использованием 2-го Международного Стандарта ВОЗ Анти-Гепатит А Иммуноглобулинов, 1998 г. Полученные данные выражены в милли-Международных единицах на миллилитр (мМЕ/мл)

Концентрация антител 20 мМЕ/мл обычно считается достаточной для гарантированного иммунитета к ВГА. Поэтому в качестве образца для критического значения оптической плотности (ОП крит.) используется стандарт с содержанием антител 20 мМЕ/мл, откалиброванный по 2-му Международному Стандарту ВОЗ для Анти-Гепатит А Иммуноглобулинов, 1998 г.).

2. ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест использует принцип конкурентного иммуноферментного анализа, основанном на использовании микропланшетов, покрытых моноклональными антителами мыши к ВГА, ВГА антигена, образца, а также конъюгата, содержащего меченные пероксидазой моноклональные антитела мыши к ВГА.

1. Во время первой инкубации образцы (или контрольные образцы) и ВГА антиген инкубируются вместе течение 1 часа при 37°C. Если антитела в ВГА присутствуют в образце, то они образуют комплекс с ВГА антигеном, тем самым предотвращая связывание антигена с антителами в составе твердой фазы (микропланшет).
2. По окончании первой инкубации на стадии промывки удаляются несвязавшийся образец, свободный ВГА антиген и комплексы ВГА/анти-ВГА, находящиеся в растворе.
3. В каждую лунку добавляется конъюгат, содержащий меченные пероксидазой моноклональные антитела мыши к ВГА, и инкубируется 1 час при 37°C. Количество конъюгата, которое связывается с твердой фазой, образуя комплекс со связанным ВГА антигеном, и ассоциированная ферментативная активность обратно пропорциональны количеству анти-ВГА антител, присутствующих в образце или контроле.
4. Избыток конъюгата удаляется с помощью промывки, и в каждую лунку добавляется хромогенный субстрат ТМБ.
5. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре реакция останавливается и проводится спектрофотометрия при длине волны 450/620-700 нм.

Определенная для образца оптическая плотность позволяет выявить присутствие или провести количественную оценку общих анти-ВГА антител в исследуемом образце.

3. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Название на этикетке	Состав и описание реактива	Количество
R1	Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, с адсорбированными моноклональными антителами к ВГА	2 планшета
R2	Промывочный раствор: 20х концентрат Трис NaCl буфера, pH 7.4 Консервант: ProClean™ (0.04 %)	1 флакон 235 мл
R3	Отрицательный контрольный образец: сыворотка человека, негативная по анти-ВГА антителам, HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам. Консервант: азид натрия (<0.1%)	1 флакон 1.5 мл
R4	Стандартный образец, положительный по анти-ВГА 20 мМЕ/мл: сыворотка человека, положительная по анти-ВГА антителам и негативная по HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам, разведенная смесью сывороток человека, негативных по анти-ВГА антителам. Консервант: азид натрия (<0.1%)	1 флакон 3.0 мл
R5	Положительный контрольный образец 80 мМЕ/мл: сыворотка человека,	1 флакон

	положительная по анти-ВГА антителам и негативная по HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам, разведенная пулированной сывороткой человека, отрицательной по анти-ВГА антителам. Консервант: азид натрия (<0.1%)	1.0 мл
R6	Вирусный антиген: Трис буфер, содержащий белок, вирус гепатита А и индикаторный краситель. Консервант: ProClean™ 300 (0.1%)	1 флакон 28 мл
R7	Конъюгат: Трис буфер, содержащий белок, конъюгаты анти-ВГА антител с пероксидазой и индикаторный краситель. Консервант: ProClean™ 300 (0.1%)	1 флакон 28 мл
R8	Субстратный раствор: Раствор лимонной кислоты и ацетата натрия, pH 4.0, содержащий H ₂ O ₂ (0.015%) и ДМСО (4%)	1 флакон 60 мл
R9	Хромоген: Окрашенный раствор, содержащий тетраметил бензидин (ТМБ)	1 флакон 5 мл
R10	Стоп-раствор: 1N раствор серной кислоты	1 флакон 28 мл
	Клейкая пленка для микропланшетов	8

4. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

- Дистиллированная или деионизованная вода.
- Гипохлорит натрия (хлорная известь) и бикарбонат натрия.
- Фильтровальная бумага.
- Одноразовые перчатки.
- Защитные очки.
- Одноразовые пробирки.
- Автоматические или полуавтоматические дозаторы с фиксированным или переменным объемом для раскапывания жидкостей объемом 50 мкл, 80 мкл, 100 мкл, 200 мкл, и 1 мл.
- Мерные цилиндры на 10 мл, 200 мл и 1000 мл.
- Вортекс.
- Автоматический*, полуавтоматический* или ручной промыватель микропланшетов.
- Водяная баня или сухой инкубатор* с температурным режимом 37°C ± 1°C.
- Контейнер для биологически опасных отходов.
- Фотометр для микропланшетов с фильтрами 490, 620, 450/620 (до 700) нм.

(*) За детальной информацией по поводу рекомендуемого оборудования обращайтесь в нашу техническую службу.

5. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены только для диагностики in vitro.

- Наименование теста, а также его идентификационный номер находятся на рамке каждого микропланшета. Идентификационный номер также нанесен на каждый стрип.
MONOLISA® Total anti-HAV PLUS: Specific ID Number = 59.
Проверьте идентификационный номер перед использованием теста. При отсутствии идентификационного номера, или его несоответствии номеру, указанному выше, стрип не использовать.
- Используйте одноразовые перчатки для работы с реагентами и образцами. Тщательно мойте руки после работы с ними.
- Не пипетируйте ртом.
- Материалы человеческой природы, использованные для получения отрицательного контроля (R3), положительного контроля (R5) и стандартного образца (R4) были исследованы, и в них не было обнаружено поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag), антител к вирусу гепатита С (ВГС) и антител к вирусам иммунодефицита (ВИЧ-1 и ВИЧ-2 Ат). Однако так как ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие инфекционных агентов, обращайтесь с реагентами и биологическими образцами, как потенциально способными к переносу инфекции.
- Все материалы, находившиеся в непосредственном контакте с биологическими образцами и реагентами, также как и промывочные растворы, должны рассматриваться как загрязненные и требуют соответствующего обращения.

- В случае разлития загрязненной жидкости поверхности должны быть обработаны от пролитых отходов 10% раствором гипохлорита натрия. Если разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия, обработать гипохлоритом натрия и высушить промокающей бумагой. Материалы, использованные для чистки, следует выбрасывать в специальный контейнер для загрязненных отходов.
- Биологические образцы и реагенты человеческого происхождения, а также загрязненные материалы, должны быть утилизированы после деcontаминации:
 - либо замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия (1 часть раствора гипохлорита натрия на 10 частей загрязненной жидкости или воды) в течение 30 минут;
 - либо автоклавированием при 121°C минимум в течение 2 часов.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: НЕ ПОМЕЩАЙТЕ В АВТОКЛАВ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИТ НАТРИЯ.

- Не допускайте попадания субстратного раствора, хромогена и стоп-раствора на кожу и слизистые оболочки. Международный сертификат безопасности предоставляется по запросу.
- Не забудьте нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, промывочный раствор после использования и любые жидкости, содержащие биологические образцы, перед их сливом в канализацию.
- Некоторые реагенты содержат азид натрия. Это соединение может вступать в реакцию со свинцовыми или медными деталями трубопроводов с образованием взрывоопасных соединений (азидов металлов). Для предотвращения накопления азидов металлов в трубопроводах при сливе содержащих азид натрия реагентов в канализацию, нейтрализуйте их и промойте раковину большим количеством воды.
- Некоторые реагенты содержат ProClean™ 300 (0,04, 0,1%).



ProClean™ 300 – раздражающее вещество

R43: может вызывать раздражение при контакте с кожей

S28-37: при попадании на кожные покровы, немедленно промойте места контакта большим количеством воды с мылом. Рекомендуется ношение соответствующей защитной одежды

- Инструкции производителя по безопасному применению каждого реагента предоставляются по запросу.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество полученных результатов зависит от соблюдения следующих правил Good Laboratory Practices:

- Не используйте реактивы с истекшим сроком годности.
- Не смешивайте реактивы из различных партий при выполнении анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11х, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 х, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 х голубого цвета или маркировка 10 х оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

- Перед использованием необходимо выдержать реагенты 30 минут при комнатной температуре для их стабилизации.
- Аккуратно разведите реагенты, избегая любого загрязнения.
- Не проводите тест в присутствии паров реактивных веществ (пары кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут изменить ферментативную активность конъюгата.
- Используйте только тщательно вымытую и ополоснутую деионизованной водой стеклянную посуду. Предпочтительно использование одноразовых материалов.
- Не допускайте пересыхания лунок микропланшета в промежутках между промывкой и внесением следующего реагента.

- Ферментативные реакции очень чувствительны к присутствию металлов или ионов металлов. Поэтому ни при каких обстоятельствах не допускайте контакта растворов, содержащих субстрат или конъюгат, с металлами.
- Раствор для проявки (смесь субстратного раствора и хромогена) должен иметь розовый цвет. Если цвет раствора изменился через несколько минут после его приготовления, то раствор непригоден для использования и должен быть заменен. Раствор для проявки может быть приготовлен в одноразовой пластиковой кювете или стеклянной ёмкости, которую перед использованием следует обработать 1N HCl, тщательно промыть дистиллированной водой и просушить. Этот реагент следует хранить в темном месте.
- Используйте новый наконечник для внесения каждого образца сыворотки.
- Правильная промывка – критический шаг в данной процедуре: соблюдайте рекомендуемое число промывочных циклов и удостоверьтесь в том, что все лунки полностью заполнены и затем полностью опорожнены. Неправильная промывка может привести к неточностям в результатах.
- Никогда не используйте один и тот же контейнер для конъюгата и раствора для проявки.

7. ОБРАЗЦЫ

Возьмите пробу крови согласно общепринятым правилам.

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранной с антикоагулянтами на основе ЭДТА, цитрата, ACD или гепарина). Если в образцах наблюдаются взвешенные частицы, то они должны быть удалены перед анализом путем центрифугирования. Агрегаты фибрина и частицы в образце могут приводить к ложно-положительным результатам.

Образцы должны храниться при +2-8 °C, если исследование будет выполнено в течение 7 дней, или подвергнуты глубокой заморозке при -20 °C. Избегайте повторного замораживания/оттаивания образцов. Если необходима транспортировка образцов, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки этиологических агентов. Рекомендуется пересылка образцов в замороженном виде.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ, А ТАКЖЕ СЫВОРОТКИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ.

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: Образцы, содержащие до 60 г/л альбумина и 100 мг/л билирубина, липемические образцы, содержащие до 36 г/л эквивалента триолеина, гемолизированные образцы с содержанием гемоглобина до 5 г/л могут быть использованы для исследования.

Образцы, негативные и позитивные по антителам к вирусу гепатита А (ВГА), были протестированы до и после 3 циклов замораживания/оттаивания. Данная обработка не влияет на выявление антител.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ - СРОК ГОДНОСТИ - УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЕ

Перед использованием следует выдержать все реагенты набора Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс в течение 30 минут при комнатной температуре для стабилизации.

1) Реагенты, готовые к применению:

Микропланшет (R1)

Каждый микропланшет состоит из 12 стрипов, установленных в рамке. Он упакован герметично в пакет, который снабжен замком-клипсой. Перед вскрытием упаковки выдержите планшет в пакете при комнатной температуре, во избежание появления конденсата в лунках планшета. Рассеките пакет ножницами или скальпелем на 0,5-1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Неиспользованные стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при +2 – 8 °C.

Отрицательный контроль (R3)

Стандартный образец 20 мМЕ/мл (R4)

Положительный контроль (R5)

Вирусный антиген (R6)

Конъюгат (R7)

Перемешать реагенты перед использованием.

2) Реагенты, требующие разведения

Промывочный раствор (R2)

Для получения рабочей концентрации промывочного раствора развести концентрат R2 1:20 дистиллированной водой. 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации достаточно для промывки одного микропланшета (12 стрипов).

Раствор для ферментативной реакции (R8+R9)

Развести реагент (R9) в пропорции 1:11 реагентом R8 (пример: 1 мл R9 в 10 мл R8). 10 мл раствора необходимо и достаточно для 1 – 12 полосок. Перемешать.

3) Реагенты для количественного теста, требующие разведения

Для количественного исследования приготовьте образцы 40 и 10 мМЕ/мл путем разведения 1:2 реагентов R4 и R5 реагентом R3.

Используемые калибровочные точки:

Cal 80 = 80 мМЕ/мл калибратора = R5

Cal 40 = 40 мМЕ/мл калибратора = разведение R5 1 : 2 в R3 (100 + 100 мкл)

Cal 20 = Положительный стандарт 20 мМЕ/мл = R4

Cal 10 = 10 мМЕ/мл калибратора = разведение R4 1 : 2 в R3 (100 + 100 мкл)

Cal 0 = 0 мМЕ/мл калибратора = R3

4) Срок годности - Условия хранения

Набор хранить при температуре +2-8°C. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе может быть использован до даты, указанной на упаковке.

R1 : После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете при +2 - 8 °C.

R2: Разведенный промывочный раствор можно использовать в течение 2-х недель при хранении +2 - 30 °C. Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при +2 - 30 °C.

R8 + R9: После приготовления реагент может использоваться в течение 6 часов при комнатной температуре (18 – 30 °C) в темном месте.

9. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

- Строго следуйте инструкции.
- Для каждого теста используйте положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток для проверки правильности выполнения теста.
- Соблюдайте правила Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practice).

Методы:

- 1) Тщательно составьте план размещения образцов в лунках и их маркировки.
- 2) Приготовьте разведенный промывочный раствор (разведенный R2) и рабочий положительный контроль антигена (R5a+R5b).
- 3) Выньте рамку микропланшета и стрипы (R1) из защитной упаковки.
- 4) Без предварительной промывки внесите последовательно в лунки микропланшета:
 - 100 мкл вирусного антигена (R6) – в каждую лунку

Для качественного анализа

50 мкл отрицательного контроля (R3) в лунку A1,
50 мкл положительного стандарта 20 мМЕ/мл (R4) в лунки B1, C1, D1,
50 мкл положительного контроля (R5) в лунку E 1,
50 мкл образца 1 в лунку F1,
50 мкл образца 2 в лунку G1, и т.д.

Для количественного анализа

50 мкл Cal 0 в лунку A1, B1
50 мкл Cal 10 мМЕ/мл в лунку C1, D1
50 мкл Cal 20 мМЕ/мл в лунку E1, F1
50 мкл Cal 40 мМЕ/мл в лунку G1, H1
50 мкл Cal 80 мМЕ/мл в лунку A2, B2
50 мкл образца 1 в лунку C2

50 мкл образца 2 в лунку D2, и т.д.

Образцы могут быть разведены в растворе отрицательного контроля R3 (Cal 0 мМЕ/мл)

Если время внесения образцов в лунки превышает 10 минут, то рекомендуется вносить растворы положительного и отрицательного контроля после внесения образцов.

ПРИМЕЧАНИЕ: После внесения образцов, цвет раствора в лунках, содержащих вирусный антиген (R6) и образец или контрольные растворы, изменится с красного на оранжевый. Наличие образца в лунках можно проконтролировать с помощью спектрофотометрии при длине волны 490 нм (измерения при одной длине волны) (см. главу 13: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

5) Если возможно, закройте микропланшет клейкой пленкой, плотно прижав ее по всей поверхности.

6) Поместите микропланшет в термостатируемую водяную баню или инкубатор для микропланшет на 60 ± 5 минут при температуре $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

7) Удалите клейкую пленку. Удалите содержимое лунок в емкость для биологически опасных отходов. Добавьте минимум 0.370 мл промывочного раствора в каждую лунку. Не менее чем через 30 секунд вновь удалите жидкости из лунок. Повторить процедуру еще минимум два раза (то есть общее число промывок составляет минимум три). Остаточный объем жидкости в лунке не должен превышать 10 мкл (при необходимости просушите планшет, перевернув его и поместив на промокательную бумагу). При использовании автоматического промывателя микропланшет следуйте той же процедуре.

8) Быстро внесите по 100 мкл раствора конъюгата (R7) во все лунки. Необходимо осторожно взболтать раствор конъюгата перед использованием. Если возможно, закройте микропланшет новой клейкой пленкой и инкубируйте 60 ± 5 минут при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$

ПРИМЕЧАНИЕ: На этой стадии внесение конъюгата, который окрашен в фиолетовый цвет, может контролироваться визуально с помощью спектрофотометрии при длине волны 620 нм (см. главу 13: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

9) Удалите клейкую пленку, удалите содержимое лунок и промойте лунки минимум 4 раза, как это описано выше.

10) Приготовьте раствор для ферментативной реакции (см. главу 8: ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ).

11) Быстро внесите в каждую лунку по 80 мкл приготовленного раствора для ферментативной реакции (R8+R9). Реакция проводится в темноте в течение 30 ± 5 минут при комнатной температуре ($18-30^\circ\text{C}$). Не используйте клейкую пленку во время этой инкубации.

ПРИМЕЧАНИЕ: На этой стадии внесение раствора для ферментативной реакции, который имеет розовый цвет, может контролироваться визуально: имеет место явная разница между пустыми лунками и лунками, содержащими розовый раствор для проявки (см. главу 13: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

12) Добавьте 100 мкл стоп-раствора (R10), используя ту же самую последовательность и скорость раскапывания, что и для раствора для ферментативной реакции.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контроль распределения бесцветного стоп-раствора по лункам на этой стадии может проводиться визуально. После добавления стоп-раствора для негативных образцов розовый субстрат становится прозрачным или голубой цвет субстрата (для положительных образцов) меняется на желтый.

13) Осторожно протрите дно микроплшета. Измерьте оптические плотности (ОП) при длинах волн 450/620-700 нм не ранее чем через 4 минуты после добавления стоп-раствора и не позднее 30 минут после остановки реакции.

14) Перед записью результатов проверьте соответствие между спектрофотометрическими и визуальными данными, а также между распределением проб и идентификационным протоколом.

10. АДАПТАЦИЯ СИСТЕМЫ

ПРОМЫВКА: Точно следуйте описанной процедуре промывки для получения максимально точного результата. В некоторых случаях может возникнуть необходимость изменения числа циклов промывки и объемов промывочного раствора для достижения приемлемых критериев достоверности результатов.

11. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ - КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Наличие или отсутствие определяемых антител к ВГА определяется посредством сравнения измеренной оптической плотности для каждого образца с рассчитанной критической оптической плотностью (ОП крит., «уровень среза»).

1. Вычисление среднего значения оптической плотности стандартного образца 20 мМЕ/мл (R4)
Пример: Стандартный образец 20 мМЕ/мл (R4)

Лунки	Оптическая плотность (ОП)
B1	0,689
C1	0,673
D1	0,680
Суммарная ОП	2,042

Средняя ОП R4 = (Суммарная ОП) / 3 = 2,042 / 3 = 0,680

2. Вычислите для каждого образца

Коэффициент реактивности = Средняя ОП R4 / ОП образца

3. Критерий достоверности результатов

- а) Для отрицательного контроля R3: значение оптической плотности должно быть больше 1,0.
б) Для стандартного образца 20 мМЕ/мл R4: для каждого стандартного образца R4 измеренная ОП должна быть больше 0,350.
Если одна из величин ОП стандартного образца 20 мМЕ/мл отличается от среднего значения более чем на 30%, то указанное значение в расчетах не использовать. Произвести повторное вычисление на основании оставшихся двух других значений ОП, полученных для стандартного образца 20 мМЕ/мл. Отношение среднего значения ОП стандартного образца 20 мМЕ/мл к значению ОП отрицательного контроля (средняя ОП R4 / ОП R3) должно быть меньше 0,6.
в) Для положительного контроля (R5): значение измеренной величины оптической плотности должно быть меньше, чем 0,300.
Коэффициент реактивности для положительного контроля (средняя ОП R4 / ОП R5) должен быть больше, чем 1,5.
Результаты теста недействительны, если хотя бы один из приведенных критериев не выполнен.

4. Интерпретация результатов

Образцы, для которых коэффициент реактивности составляет менее 0,9, считаются отрицательными по тесту Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс.
Образцы, для которых коэффициент реактивности составляет 1,1 или больше, считаются положительными по тесту Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс.
Образцы, для которых отношение больше или равно 0,9, но меньше 1,1, должны быть проанализированы повторно.
После повторного исследования образцы считаются положительными по тесту Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс, если отношение больше или равно 1,1. Образцы считаются отрицательными, если отношение менее 0,9. Если отношение больше или равно 0,9, но менее 1,1, то интерпретация результата невозможна и необходимо исследование нового образца, взятого у того же пациента.

12. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

-КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД

1. Вычисление средних значений ОП для каждого калибратора

Пример: Cal 40 мМЕ/мл

Лунки	Оптическая плотность (ОП)
G1	0,295
H1	0,292
Суммарная ОП	0,587

Средняя ОП калибратора 40 мМЕ/мл = (Суммарная ОП) / 2 = 0,587 / 2 = 0,2935

2. Критерии достоверности результатов

а) Для отрицательного контроля R3 (Cal 0 мМЕ/мл):

для каждого отрицательного контроля значение оптической плотности должно быть больше 1,0.

б) Для стандартного образца R4 (Cal 20 мМЕ/мл):

для каждого стандартного образца R4 измеренная ОП должна быть больше 0,350.

Отношение среднего значения ОП стандартного образца 20 мМЕ/мл к среднему значению ОП отрицательного контроля (средняя ОП R4 / средняя ОП R3) должно быть меньше 0,6.

в) Для положительного контроля R5 (Cal 80 мМЕ/мл):

значение каждой измеренной величины оптической плотности должно быть меньше, чем 0,300.

Отношение средней ОП стандартного образца к ОП положительного контроля (средняя ОП R4 / ОП R5) должно быть больше, чем 1,5.

г) Средняя ОП Cal 0 > Средняя ОП Cal 10 мМЕ/мл

Средняя ОП Cal 10 > Средняя ОП Cal 20 мМЕ/мл

Средняя ОП Cal 20 > Средняя ОП Cal 40 мМЕ/мл

Средняя ОП Cal 40 > Средняя ОП Cal 80 мМЕ/мл

При невыполнении хотя бы одного из указанных критериев результаты теста являются недействительными

3. Интерпретация результатов

Значения оптических плотностей каждого калибратора откладываются по оси X, соответствующие значения концентраций антител к ВГА в мМЕ/мл – по оси Y.

Концентрация антител к ВГА (в мМЕ/мл) в каждом образце определяются по построенному графику для калибраторов путем установления соответствия полученной для него ОП на оси X концентрации антител к ВГА на оси Y.

Определите значения концентрации для исследованных образцов по графику. Если было произведено разведение образца перед исследованием, то необходимо умножить полученное значение концентрации антител к ВГА на кратность разведения.

Если концентрация антител против ВГА в исследованном образце составляет менее 18 мМЕ/мл, то результат теста Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс считается отрицательным.

Если концентрация антител против ВГА в исследованном образце больше или равна 22 мМЕ/мл, то результат теста Монолиза® Общие Анти-ВГА считается положительным.

Если концентрация антител против ВГА в исследованном образце больше или равна 18 мМЕ/мл, но меньше, чем 22 мМЕ/мл, то следует провести повторное исследование этого образца. После повторения исследования результат теста Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс считается отрицательным, если концентрация антител к ВГА в исследованном образце составляет менее 18 мМЕ/мл. Результат теста Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс считается положительным, если концентрация антител к ВГА в исследованном образце больше или равна 22 мМЕ/мл.

Если после повторения исследования концентрация антител к ВГА в исследованном образце больше или равна 18 мМЕ/мл, но меньше, чем 22 мМЕ/мл, то результат считается не поддающимся интерпретации и необходимо исследование нового образца.

13. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ (ОПЦИЯ)

Контроль внесения вирусного антигена (R6) и образцов

Присутствие образца и раствора вирусного антигена (R6) в лунке можно проконтролировать с помощью спектрофотометрического анализа при длине волны 490 нм: значение ОП для каждой лунки, содержащей раствор вирусного антигена (R6), должно быть больше или равно 0,500.

После добавления образца, увеличение ОП в каждой лунке должно составлять как минимум 0,100

Контроль раскапывания образца невозможен в случае предварительного смешивания реагента R6 и образца.

ПРИМЕЧАНИЕ: После внесения образца цвет раствора вирусного антигена R6 изменяется с красного на оранжевый.

Контроль внесения конъюгата (R7)

Присутствие конъюгата (R7) в лунке можно проконтролировать с помощью спектрофотометрии при длине волны 620 нм: значение ОП для каждой лунки должно быть больше или равно 0,500.

ПРИМЕЧАНИЕ: Раствор конъюгата (R7) окрашен в фиолетовый цвет.

Контроль внесения раствора для ферментативной реакции (R8+R9)

Присутствие раствора для ферментативной реакции (R8+R9) в лунке можно проконтролировать посредством спектрофотометрии при длине волны 490 нм: величина ОП для каждой лунки должна быть больше или равна 0,100 (ОП ниже этого значения указывает на неадекватное внесение раствора для проявки).

ПРИМЕЧАНИЕ: после добавления раствора для ферментативной реакции в пустую лунку происходит заметное изменение цвета с бесцветного на розовый.

14. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Набор Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс был испытан в 3 исследовательских центрах путем выборочного исследования образцов крови доноров, образцов крови пациентов с ВГА инфекцией, коммерческих панелей, сероконверсионных панелей и панелей образцов, собранных после вакцинации.

А - Специфичность

При скрининге 561 случайно выбранных образцов донорской крови было установлено, что специфичность составляет 100% [99.57% - 100%] (IC 95), 561/561.

Также был проведен скрининг 700 замороженных и не замороженных образцов, взятых у больных. Специфичность теста в данном исследовании составила 100% [99.57%-100%] (IC 95), 700/700.

Произведено параллельное исследование 192 образцов, полученных от пациентов с различными заболеваниями/состояниями, не связанными с гепатитом А (беременность, ревматоидные состояния, антитела к ядерным белкам, антитела к иммуноглобулинам мыши или другие вирусные и бактериальные инфекции), с помощью набора Монолиза® Общие Анти-ВГА и коммерческого ИФА набора. Совпадение результатов составило 99.48% (191/192). Специфичность теста составила 100% (95/95) (доверительный интервал - 95%) 203/204. Один образец вакцины гриппа дал положительный результат при исследовании с помощью альтернативного коммерческого ИФА набора и отрицательный результат при исследовании с использованием набора Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс.

В - Чувствительность

Для определения чувствительности были исследованы 424 положительных образца донорской крови и 1274 положительных образца из трех различных источников. Всего с помощью набора Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс было проскринировано 1689 образцов, и результаты исследования были сравнены с результатами коммерческого ИФА набора. Было установлено, что чувствительность составляет 100% как для образцов донорской крови, так и для клинических образцов.

Были также исследованы 3 коммерческие ВГА сероконверсионных панели и 12 пост-вакцинационных панелей, и результаты были сравнены с результатами коммерческого ИФА набора. Совпадение результатов исследований составило 100%.

С - Точность

Количественные результаты представляют в мМЕ/мл относительно 2-го Международного Стандарта ВОЗ Анти-Гепатит А Иммуноглобулин 1998.

Проводились исследования корреляции между стандартами с концентрацией 0, 10, 20, 40, 80 мМЕ/мл, предоставленных ВОЗ и калибраторами набора. Коэффициент корреляции и угловой коэффициент линейной регрессии при построении корреляционной зависимости составил 0,98 и 1, 04 соответственно.

Д - Воспроизводимость

Воспроизводимость Монолиза® Общие Анти-ВГА Плюс определялась при исследовании 4 образцов: 1 отрицательного и 3 положительных по ВГА Ат (слабоположительный, среднеположительный и резкоположительный) образцов.

Для оценки воспроизводимости анализа в одном исследовании проводили исследование этих 4 образцов 30 раз каждый в одном и том же исследовании. Для оценки воспроизводимости анализа в разных тестах исследовали эти 4 образца в двукратном повторе в течение 20 дней, проводя 2 независимых исследования каждый день. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1: Воспроизводимость результатов в одной постановке

Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный
Среднее значение отношения	0.43	2.35	3.08	4.29
Стандартное отклонение	0.02	0.15	0.19	0.19
Коэффициент	4.87	6.50	6.29	4.47

вариации, %				
Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный.
Среднее значение титра	2.28	39.96	67.33	>80
Стандартное отклонение	1.21	2.69	5.26	ND
Коэффициент вариации, %	43.53	6.72	7.81	ND

Таблица 2: Воспроизводимость результатов между постановками

Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный
Среднее значение отношения	0.45	2.13	3.43	4.80
Стандартное отклонение	0.03	0.29	0.33	0.49
Коэффициент вариации, %	6.31	13.68	9.61	10.23

Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный
Среднее значение титра	3.10	38.91	71.88	>80
Стандартное отклонение	1.24	3.65	4.13	NA
Коэффициент вариации, %	39.96	9.38	5.75	NA

15. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Результат единичного теста не может являться достаточным основанием для постановки диагноза инфекционного заболевания. Клиническая картина, симптомы, а также результаты серологического исследования должны быть обязательно учтены при постановке диагноза.

Бактериальная контаминация образцов может исказить значения оптической плотности образца.

16. ЛИТЕРАТУРА

См. Французскую версию.

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Монолиза® ВГА IgM Плюс – набор для иммуноферментного анализа для определения антител класса IgM к ВГА в сыворотке или плазме крови человека.

Наличие антител класса IgM к ВГА в кровотоке свидетельствует о недавнем контакте с вирусом гепатита А (ВГА). Анти-ВГА антитела класса IgM появляются спустя несколько дней после инфекции и присутствуют в повышенных количествах в кровотоке в течение нескольких месяцев. Однако чувствительные иммуноферментные анализы иногда позволяют выявлять IgM на протяжении года после острой инфекции.

2. ПРИНЦИП ТЕСТА

Монолиза® ВГА IgM Плюс является иммуноферментным анализом, основанном на связывании IgM антител в образце с сорбированными на микропланшете поликлональными антителами к иммуноглобулинам класса М человека.

1. Сначала образец и реагент для разведения образцов вносятся в лунку микропланшета и инкубируются в течение 1 часа при 37°C. Избыток образца удаляется на стадии промывки после инкубации.
2. Затем в лунку последовательно вносятся первый реагент, содержащий ВГА вирусный антиген, и второй реагент с ферментативным индикатором, содержащим меченные пероксидазой моноклональные антитела мыши к ВГА, и проводится инкубация в течение 1 часа при 37°C. Присутствие анти-ВГА IgM делает возможным связывание ВГА и ферментативного индикатора с твердой фазой (микропланшет).
3. Избыток ферментативного индикатора и ВГА удаляется с помощью промывки, и в каждую лунку добавляется хромогенный субстрат ТМБ.
4. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре реакция останавливается и проводится спектрофотометрия при длине волны 450/620-700 нм. Определенная для образца оптическая плотность позволяет установить присутствие или отсутствие анти-ВГА IgM в исследуемом образце. Интенсивность окраски пропорциональна количеству анти-ВГА IgM, связанных с твердой фазой.

3. СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Название на этикетке	Состав и описание реактива	Количество
R1	Микропланшет: 12 стрипов по 8 лунок, сорбированный поликлональными антителами к IgM	2 планшета
R2	Промывочный раствор: 20х концентрат Трис NaCl буфера, pH 7.4 Консервант: ProClean™ (0.04 %)	1 флакон 235 мл
R3	Отрицательный контроль: сыворотка человека, негативная по анти-ВГА антителам класса IgM, общим анти-ВГА антителам, HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам	1 флакон 1 мл
R4	Положительный стандарт «уровня среза»: сыворотка человека, положительная по анти-ВГА антителам класса IgM и негативная по HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам, разведенная цветным синтетическим растворителем. Консервант: азид натрия (<0.1%), ProClean™ 300 (0.1%)	1 флакон 1.6 мл
R5	Положительный контроль: сыворотка человека, положительная по анти-ВГА антителам класса IgM и негативная по HBs антигену, анти-ВГС антителам и анти-ВИЧ 1-2 антителам, разведенная смесью сывороток человека, негативных по анти-ВГА антителам. Консервант: азид натрия (<0.1%)	1 флакон 1 мл
R6	Реагент для разведения образцов: Трис буфер, содержащий белок и индикаторный краситель. Консервант: ProClean™ 300 (0.1%)	1 флакон 21 мл
R7a	Вирусный антиген: Трис буфер, содержащий белок, инактивированный вирус гепатита А и идентифицирующий реагент краситель. Консервант: ProClean™ 300 (0.1%)	1 флакон 13 мл
R7b	Конъюгат: Моноклональные антитела мыши к ВГА – пероксидаза Трис буфер, содержащий белки, детергент, конъюгат (меченные пероксидазой)	1 флакон 13 мл

	моноклональные антитела мыши к ВГА) и идентифицирующий реагент краситель. Консервант: ProClean™ 300 (0.1%)	
R8	Субстратный раствор: Раствор лимонной кислоты и ацетата натрия, pH 4.0, содержащий H ₂ O ₂ (0.015%) и ДМСО (4%)	1 флакон 60 мл
R9	Хромоген: Окрашенный раствор, содержащий тетраметил бензидин (ТМБ)	1 флакон 5 мл
R10	Стоп-раствор: 1N раствор серной кислоты	1 флакон 28 мл

4. ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В КОМПЛЕКТ ПОСТАВКИ

Дистиллированная или деионизованная вода.

Гипохлорит натрия (бытовой отбеливатель) и бикарбонат натрия.

Промокательная бумага.

Одноразовые перчатки.

Защитные очки.

Автоматические или полуавтоматические дозаторы с фиксированным или переменным объемом для расщипывания жидкостей объемом 50 мкл, 80 мкл, 100 мкл, 200 мкл, и 1 мл.

Мерные цилиндры на 10 мл, 200 мл и 1000 мл.

Вортекс.

Автоматический*, полуавтоматический* или ручной промыватель микропланшет.

Водяная баня или сухой инкубатор* с температурным режимом 37°C ± 1°C.

Контейнер для биологически опасных отходов.

Фотометр для микропланшет (с фильтрами 490, 620, 450/620 до 700 нм).

(*) За детальной информацией по поводу рекомендуемого оборудования обращайтесь в нашу техническую службу.

5. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Все реагенты, входящие в состав набора, предназначены только для диагностики in vitro.

Наименование теста, а также его идентификационный номер находятся на рамке каждого микропланшета. Идентификационный номер также нанесен на каждый стрип.

MONOLISA® HAV IgM PLUS: Specific ID Number = 58.

Проверьте идентификационный номер перед использованием теста. При отсутствии идентификационного номера или его несоответствии номеру, указанному выше, стрип не использовать.

Используйте одноразовые перчатки для работы с реагентами и образцами. Тщательно мойте руки после работы с ними.

Не гипетируйте ртом.

Плазмы крови человека, использованные для получения отрицательного контроля (R3), положительного контроля (R5) и положительного стандарта «уровня среза» (R4) были исследованы, и в них не было обнаружено поверхностного антигена гепатита В (HBs Ag), антител к вирусу гепатита С (ВГС) и антител к вирусам иммунодефицита (ВИЧ-1 и ВИЧ-2 Ат). Однако так как ни один из известных методов исследования не может полностью гарантировать отсутствие инфекционных агентов, обращайтесь с реагентами и биологическими образцами, как потенциально способными к переносу инфекции.

Все материалы, находившееся в непосредственном контакте с биологическими образцами и реагентами, также как и промывочные растворы, должны рассматриваться как загрязненные и требуют соответствующего обращения.

Избегайте пролива биологических образцов и содержащих их растворов.

Поверхности должны быть обработаны от пролитой жидкости 10% раствором гипохлорита натрия. Если разлита кислота, ее необходимо вначале нейтрализовать бикарбонатом натрия, обработать гипохлоритом натрия и высушить промокательной бумагой. Материалы, использованные для чистки, следует выбрасывать в специальный контейнер для загрязненных отходов.

Биологические образцы и реагенты человеческого происхождения, а также загрязненные материалы, должны быть утилизированы после деконтаминации:

- либо замачиванием в 5% растворе гипохлорита натрия (1 часть раствора гипохлорита натрия на 10 частей загрязненной жидкости или воды) в течение 30 минут;
- либо автоклавированием при 121°C минимум в течение 2 часов.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ: НЕ ПОМЕЩАЙТЕ В АВТОКЛАВ РАСТВОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГИПОХЛОРИТ НАТРИЯ.

Не допускайте попадания субстратного раствора, хромогена и стоп-раствора на кожу и слизистые оболочки. Перечень данных по технике безопасности предоставляется по запросу.

Не забудьте нейтрализовать и/или автоклавировать растворы, промывочный раствор после использования и любые жидкости, содержащие биологические образцы, перед их сливом в канализацию.

Некоторые реагенты содержат азид натрия. Это соединение может вступать в реакцию со свинцовыми или медными деталями трубопроводов с образованием взрывоопасных соединений (азидов металлов). Для предотвращения накопления азидов металлов в трубопроводах при сливе содержащих азид натрия реагентов в канализацию, нейтрализуйте их и промойте раковину большим количеством воды.

Некоторые реагенты содержат ProClean™ 300 (0,04, 0,1%).



20 199911

ProClean™ 300 – раздражающее вещество

R43: может вызывать раздражение при контакте с кожей

S28-37: при попадании на кожные покровы, немедленно промыть места контакта большим количеством воды с мылом. Рекомендуется ношение соответствующей защитной одежды

Инструкции производителя по безопасному применению каждого реагента предоставляются по запросу.

6. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Качество полученных результатов зависит от соблюдения следующих правил Good Laboratory Practices:

Не используйте реактивы с истекшим сроком годности.

Не смешивайте реактивы из различных партий при выполнении анализа.

ПРИМЕЧАНИЕ. Для следующих реагентов: промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета), субстратный раствор (R8, маркировка: TMB buf, синего цвета), хромоген (R9, маркировка: TMB 11x, пурпурного цвета) и стоп-реагент (R10, маркировка 1N, красного цвета) при постановке теста можно использовать серии отличные от тех, которые входят в набор. Тем не менее, для каждой постановки теста должны использоваться реагенты одной серии. Данные реагенты допускается использовать с некоторыми другими продуктами компании. Подробные сведения можно получить в службе технической поддержки. В дополнение, промывочный раствор (R2, маркировка: 20 x, зеленого цвета) может использоваться в смеси с 2 другими промывочными растворами, которые входят в состав различных диагностических наборов производства Био-Рад (R2, маркировка: 10 x голубого цвета или маркировка 10 x оранжевого цвета) в соответствующем разведении, необходимым условием является использование одной такой смеси в одной постановке. Для получения подробной информации свяжитесь с местным представительством компании.

Перед использованием необходимо выдерживать реагенты 30 минут при комнатной температуре для их стабилизации.

Аккуратно разведите реагенты, избегая любого загрязнения.

Не проводите тест в присутствии паров реактивных веществ (пары кислот, щелочей, альдегидов) или пыли, которые могут изменить ферментативную активность конъюгата.

Используйте только тщательно вымытую и ополоснутую деионизованной водой стеклянную посуду. Предпочтительно использование одноразовых материалов.

Не допускайте высыхания лунок микропланшета в промежутках между промывкой и внесением следующего реагента.

Ферментативные реакции очень чувствительны к присутствию металлов или ионов металлов. Поэтому ни при каких обстоятельствах не допускайте контакта растворов, содержащих субстрат или конъюгат, с металлами.

Раствор для проявки (смесь субстратного раствора и хромогена) должен иметь розовый цвет. Если цвет раствора изменился через несколько минут после его приготовления, то раствор непригоден для использования и должен быть заменен.

Раствор для проявки может быть приготовлен в одноразовой пластиковой кювете или стеклянной ёмкости, которую перед использованием следует обработать 1N HCl, тщательно промыть дистиллированной водой и просушить. Этот реагент следует хранить в темном месте.

Используйте новый наконечник для внесения каждого образца сыворотки.

Правильная промывка – критический шаг в данной процедуре: соблюдайте рекомендуемое число промывочных циклов и удостоверьтесь в том, что все лунки полностью заполнены и затем полностью опорожнены. Неправильная промывка может привести к неточностям в результатах.

Никогда не используйте один и тот же контейнер для конъюгата и раствора для проявки.

7. ОБРАЗЦЫ

Возьмите пробу крови согласно текущим правилам.

Исследование должно быть выполнено на неразведенной сыворотке или плазме (собранной с антикоагулянтами на основе ЭДТА, цитрата, ACD или гепарина). Если в образцах наблюдаются взвешенные частицы, то они должны быть удалены перед анализом путем центрифугирования. Агрегаты фибрина и частицы в образце могут приводить к ложно-положительным результатам.

Образцы должны храниться при +2-8°C, если исследование будет выполнено в течение 7 дней, или подвергнуты глубокой заморозке при -20°C. Избегайте повторного замораживания/оттаивания образцов.

Если необходима транспортировка образцов, их следует упаковать в соответствии с правилами транспортировки этиологических агентов. Рекомендуется пересылка образцов в замороженном виде.

НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ КОНТАМИНИРОВАННЫЕ И ГЕМОЛИЗИРОВАННЫЕ СЫВОРОТКИ, А ТАКЖЕ СЫВОРОТКИ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ.

ОБРАТИТЕ ВНИМАНИЕ: Образцы, содержащие до 90 г/л альбумина и 100 мг/л билирубина, липемические образцы, содержащие до 36 г/л эквивалента триолеина, гемолизированные образцы с содержанием гемоглобина до 5 г/л могут быть использованы для исследования.

Образцы, негативные и позитивные по антителам к ВГА класса IgM, были протестированы до и после обработки при 56°C в течение 30 минут и после 3 циклов замораживания/оттаивания. Эти обработки не влияют на выявление антител.

8. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ - СРОК ГОДНОСТИ - УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЕ

Перед использованием следует выдержать все реагенты набора Монолиза® ВГА IgM Плюс в течение 30 минут при комнатной температуре для стабилизации.

1) Реагенты, готовые к применению:

Микропланшет (R1)

Каждый микропланшет состоит из 12 стрипов, установленных в рамке. Он упакован герметично в пакет, который снабжен замком-клипсой. Перед вскрытием упаковки выдержите планшет в пакете при комнатной температуре, во избежание появления конденсата в лунках планшета. Рассеките пакет ножницами или скальпелем на 0,5-1 см выше линии клипсы. Откройте его и достаньте планшет. Неиспользованные стрипы положите в пакет, запечатайте и храните при +2 – 8 °C.

Отрицательный контроль (R3)

Положительный стандарт «уровня среза» (R4)

Положительный контроль (R5)

Реагент для разведения образцов (R6)

Вирусный антиген (R7a)

Конъюгат (R7b)

Перемешать реагенты перед использованием.

2) Реагенты, требующие разведения

Промывочный раствор (R2)

Для получения рабочей концентрации промывочного раствора развести концентрат R2 1:20 дистиллированной водой. 800 мл промывочного раствора в рабочей концентрации достаточно для промывки одного микропланшета (12 стрипов).

Раствор для проявки (R8+R9)

Развести реагент (R9) в пропорции 1:11 реагентом R8 (пример: 1 мл R9 в 10 мл R8). 10 мл раствора необходимо и достаточно для 1-12 полосок. Перемешать.

3) Срок годности - Условия хранения

Набор хранить при температуре +2-8°C. При соблюдении данного температурного режима любой реагент, содержащийся в наборе может быть использован до даты, указанной на упаковке.

R1 : После вскрытия вакуумной упаковки стрипы можно использовать в течение 1-го месяца, сохраняя их в аккуратно запечатанном пакете при +2 - 8 °C.

R2: Разведенный промывочный раствор можно использовать в течение 2-х недель при хранении +2 - 30 °C. Концентрат промывочного раствора (R2) может храниться при +2 - 30 °C.

R8 + R9: После приготовления реагент может использоваться в течение 6 часов при комнатной температуре (18 – 30 °C) в темном месте.

11. МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Строго следуйте инструкции.

Для каждого теста используйте положительный и отрицательный контрольные образцы сывороток для проверки правильности выполнения теста.

Соблюдайте правила Хорошей Лабораторной Практики (Good Laboratory Practice).

Методы

1) Тщательно составьте план размещения образцов в лунках и их маркировки.

2) Приготовьте разведенный промывочный раствор (разведенный R2).

3) Выньте рамку микропланшета и стрипы (R1) из защитной упаковки.

4) Без предварительной промывки внесите последовательно в лунки микропланшета:

- 80 мкл реагента для разведения образцов (R6) – в каждую лунку

ПРИМЕЧАНИЕ: Возможно проведение контроля внесения раствора для разведения образцов в лунки посредством спектрофотометрии при длине волны 620 нм (измерения при одной длине волны) (см. главу 12: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

20 мкл отрицательного контроля (R3) в лунку A1,

20 мкл положительного стандарта «уровня среза» (R4) в лунки B1, C1 и D1,

20 мкл положительного контроля (R5) в лунку E1,

20 мкл образца 1 в лунку F1,

20 мкл образца 2 в лунку G1, и т.д.

Перемешайте внесенные реагенты. Если время внесения образцов в лунки превышает 10 минут, то рекомендуется вносить растворы положительного и отрицательного контроля после внесения образцов. Сразу по окончании внесения образцов переходите к инкубации микропланшета.

ПРИМЕЧАНИЕ: После внесения образцов (или контрольных образцов, или стандарта «уровня среза») цвет раствора в лунках изменится с фиолетового на темно-синий. Наличие образца в лунках можно проконтролировать с помощью спектрофотометрии при длине волны 620 нм (см. главу 12: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

5) Если возможно, закройте микропланшет клейкой пленкой, плотно прижав ее по всей поверхности.

6) Поместите микропланшет в термостатируемую водяную баню или инкубатор для микропланшет на 60±5 минут при температуре 37°C ±1°.

7) Удалите клейкую пленку. Аспирируйте содержимое лунок в емкость для биологически опасных отходов. Добавьте минимум 0.370 мл промывочного раствора в каждую лунку. Не менее чем через 30 секунд вновь удалите жидкости из лунок. Повторить процедуру еще минимум два раза (то есть общее число промывок составляет минимум три). Остаточный объем жидкости в лунке не должен превышать 10 мкл (при необходимости просушите планшет, перевернув его и поместив на промокательную бумагу). При использовании автоматического промывателя микропланшет следуйте той же процедуре.

8) Быстро внесите по 50 мкл вирусного антигена (R7a) во все лунки. Необходимо осторожно взболтать раствор вирусного антигена перед использованием.

9) Быстро внесите по 50 мкл конъюгата (R7b) во все лунки. Необходимо осторожно взболтать раствор конъюгата перед использованием. Перемешайте внесенные реагенты.

ПРИМЕЧАНИЕ: Смесь вирусного антигена и конъюгата имеет темно-зеленый цвет. Возможно проведение контроля присутствия обоих реагентов спектрофотометрией при двух длинах волн (450 нм и 620 нм) (см. главу 12: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ

ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

10) Если возможно, закройте микропланшет новой клейкой пленкой и инкубируйте 60 ± 5 минут при $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Инкубацию следует проводить в водяной бане или инкубаторе для микропланшет с температурным режимом $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 ± 5 минут.

11) Удалите клейкую пленку, аспирируйте содержимое лунок и промойте лунки минимум 4 раза, как это описано выше.

12) Приготовьте раствор для проявки (R8+R9) (см. главу 8: ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ).

13) Быстро внесите в каждую лунку по 80 мкл приготовленного раствора для проявки (R8+R9). Реакция проводится в темноте в течение 30 ± 5 минут при комнатной температуре ($18-30^\circ\text{C}$). Не используйте клейкую пленку во время этой инкубации.

ПРИМЕЧАНИЕ: На этой стадии внесение раствора для проявки, который имеет розовый цвет, может контролироваться визуально: имеет место явная разница между пустыми лунками и лунками, содержащими розовый раствор для проявки (см. главу 12: СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ)

14) Добавьте 100 мкл стоп-раствора (R10), используя ту же самую последовательность и скорость распыливания, что и для раствора для проявки.

ПРИМЕЧАНИЕ: Контроль распределения бесцветного стоп-раствора по лункам на этой стадии может проводиться визуально. После добавления стоп-раствора для негативных образцов розовый субстрат становится прозрачным или голубой цвет (для положительных образцов) меняется на желтый.

15) Осторожно протрите дно микропланшета. Измерьте оптические плотности (ОП) при длинах волн 450/620-700 нм не ранее чем через 4 минуты после добавления стоп-раствора и не позднее 30 минут после остановки реакции.

16) Перед записью результатов проверьте соответствие между спектрофотометрическими и визуальными данными, а также между распределением проб и идентификационным протоколом.

10. АДАПТАЦИЯ СИСТЕМЫ

ПРОМЫВКА: Точно следуйте описанной процедуре промывки для получения максимально точного результата. В некоторых случаях может возникнуть необходимость изменения числа циклов промывки и объемов промывочного раствора для достижения приемлемых критериев достоверности результатов.

11. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Наличие или отсутствие определяемых антител к ВГА класса IgM определяется посредством сравнения измеренной оптической плотности для каждого образца с рассчитанной критической оптической плотностью («уровень среза»).

1. Вычисление среднего значения оптической плотности положительного стандарта «уровня среза» (R4)

Пример: Положительный стандарт «уровня среза»

Лунки	Оптическая плотность (ОП)
B1	1.351
C1	1.402
D1	1.376
Суммарная ОП	4.129

Средняя ОП R4 = Суммарная оптическая плотность / 3 = $4.129 / 3 = 1.376$

2. Вычисление критической оптической плотности «уровня среза» (CO)

CO = Средняя ОП R4 / 4

Пример: Средняя ОП R4 = 1.376

CO = $1.376 / 4 = 0.344$

3. Вычислите для каждого образца

Отношение = ОП образца / CO

4. Критерий достоверности результатов

а) Для отрицательного контроля R3: значение оптической плотности должно быть менее 0.080.

б) Для положительного стандарта «уровня среза» R4:

Среднее измеренных значений оптических плотностей должно быть больше 0.600 и меньше 2.900.

Если одна из величин ОП положительного стандарта «уровня среза» отличается от среднего значения более чем на 30%, то указанное значение в расчетах не использовать. Произвести повторное вычисление на основании оставшихся двух других значений ОП, полученных для положительного стандарта «уровня среза».

- в) Для положительного контроля (R5): значение измеренной величины оптической плотности должно быть больше или равно ОС (Отношение ≥ 1).

Результаты теста недействительны, если получены значения для отрицательного контроля R3, положительного контроля R5 и/или более чем одного из положительных стандартов «уровня среза» находятся вне вышеуказанных интервалов.

5. Интерпретация результатов

Образцы, для которых отношение составляет менее 0.8 (Отношение < 0.8), считаются отрицательными по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс.

Образцы, для которых отношение составляет 1 или больше (Отношение ≥ 1), считаются положительными по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс.

Образцы, для которых отношение больше или равно 0.8, но меньше 1 ($1 > \text{Отношение} \geq 0.8$), должны быть исследованы еще раз в двукратном повторе для окончательной интерпретации результатов.

После повторного исследования образцы считаются положительными по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс, если полученные в результате второго и третьего анализов значения ОП больше или равны значению СО (Отношение ≥ 1). Образцы считаются отрицательными по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс, если оба полученных значения ОП меньше, чем значение СО (Отношение < 1).

12. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ ДОЗИРОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ (ОПЦИЯ)

Контроль внесения реагента для разведения образцов

Присутствие в лунках реагента для разведения образцов (R6), который окрашен в фиолетовый цвет, можно контролировать с помощью спектрофотометрического анализа при длине волны 620 нм.

Значение ОП для каждой лунки, содержащей реагент для разведения образцов (R6), должно быть больше или равно 0.600, и меньше или равно 1.200 ($0.600 \leq \text{ОП R6} \leq 1.200$).

Контроль внесения образцов

Присутствие образца в лунке можно проконтролировать с помощью спектрофотометрического анализа при длине волны 620 нм. Значение ОП для каждой лунки, содержащей реагент для разведения образцов и образец (или контрольные образцы, или стандарт «уровня среза»), должно быть больше или равно 1.250.

ПРИМЕЧАНИЕ: После внесения образца цвет реагента для разведения образцов изменяется с фиолетового на темно-синий.

Контроль внесения вирусного антигена (R7a) и конъюгата (R7b)

Одновременное присутствие вирусного антигена (R7a) и конъюгата (R7b) в лунке можно проконтролировать с помощью спектрофотометрии при длинах волн 450 нм и 620 нм. Значение ОП для каждой лунки должно быть больше или равно 0.700 при измерении при обеих длинах волн (значение ОП менее 0.700 указывает на неправильное внесение вирусного антигена или конъюгата).

ПРИМЕЧАНИЕ: Вирусный антиген (R7a) окрашен в красный цвет, конъюгат (R7b) окрашен в синий цвет. Смешивание этих двух реагентов приводит к темно-зеленой окраске раствора.

Контроль внесения раствора для проявки (R8+R9)

Присутствие раствора для проявки (R8+R9) в лунке можно проконтролировать посредством спектрофотометрии при длине волны 490 нм: величина ОП для каждой лунки должна быть больше или равна 0.100 (ОП ниже этого значения указывает на неадекватное внесение раствора для проявки).

ПРИМЕЧАНИЕ: после добавления раствора для проявки в пустую лунку происходит заметное изменение цвета - с бесцветного до розового.

13. ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Набор Монолиза® ВГА IgM Плюс был испытан в 3 исследовательских центрах путем выборочного исследования образцов крови доноров, образцов крови пациентов с острой ВГА инфекцией или с заболеваниями и состояниями, не связанными с гепатитом А, коммерческих панелей и сероконверсионных панелей.

А - Специфичность

При скрининге 525 случайно выбранных образцов донорской крови было установлено, что специфичность составляет 99.81% [98.94% - 100%] (IC 95), 524/525. Образец, определенный по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс несколько раз как положительный был определен как отрицательный при использовании коммерческого ИФА набора.

Также был проведен скрининг 845 замороженных и не замороженных образцов, взятых у больных. Специфичность теста в данном исследовании составила 99.53% [98.79%-100%] (IC 95), 841/845.

Произведено исследование 204 образцов, полученных от пациентов с различными заболеваниями/состояниями, не связанными с гепатитом А (беременность, ревматоидные состояния, антитела к ядерным белкам, антитела к иммуноглобулинам мыши или другие вирусные и бактериальные инфекции), с помощью набора Монолиза® ВГА IgM Плюс. Специфичность теста составила 99.51% [97.30-99.99%] (IC 95), (203/204). Один образец, содержащий IgG к ЭБВ, был определен как положительный при использовании набора Монолиза® ВГА IgM Плюс. 9 других исследованных образцов, содержащих IgG к ЭБВ, были определены по тесту Монолиза® ВГА IgM Плюс как отрицательные.

В - Чувствительность

Для определения чувствительности был исследован 161 положительный образец, полученные от пациентов. После сопоставления с результатами анализа с использованием коммерческого ИФА теста было установлено, что чувствительность составила 98.14% [94/65%-99/61%] (IC 95), 158/161. Три конфликтных образца, определенные как негативные с использованием теста Монолиза® ВГА IgM Плюс, были получены от пожилых людей без признаков острой ВГА инфекции, что предполагает возможную поликлональную реактивацию. Два из этих трех образцов были также определены как отрицательные с использованием другого коммерческого ИФА теста.

Были также исследованы 17 коммерческих ВГА сероконверсионных панелей и результаты были сравнены с коммерческим ИФА набором. Совпадение результатов исследований составило 100%.

С - Воспроизводимость

Воспроизводимость Монолиза® ВГА IgM Плюс определялась при исследовании 4 образцов: 1 отрицательного и 3 положительных по антителам к ВГА класса IgM (слабоположительный, среднеположительный и резкоположительный) образцов.

Для оценки воспроизводимости анализа в одном исследовании проводили исследование этих 4 образцов 30 раз каждый в одном и том же исследовании. Для оценки воспроизводимости анализа в разных тестах исследовали эти 4 образца в двукратном повторе в течение 20 дней, проводя 2 независимых исследования каждый день. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1: Воспроизводимость результатов внутри теста

Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный
Среднее значение отношения	0.05	1.53	2.93	4.22
Стандартное отклонение	0.00	0.06	0.09	0.13
Коэффициент вариации, %	5.05	4.18	3.15	3.06

Таблица 2: Воспроизводимость результатов между тестами

Образец	Отрицательный	Слабоположительный	Среднеположительный	Резкоположительный
Среднее значение отношения	0.07	1.34	2.58	3.99
Стандартное отклонение	0.02	0.11	0.22	0.28
Коэффициент вариации, %	22.88	8.57	8.48	7.12

14. ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Результат единичного теста не может являться достаточным основанием для постановки диагноза инфекционного заболевания. Клиническая картина, симптомы, а также результаты серологического исследования должны быть обязательно учтены при постановке диагноза.