

# НАБІР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ IgM ДО ПАРВОВІРУСУ В19

## Parvovirus B19 IgM

Кат. № : **PARVOM.CE**

Дата випуску інструкції: **2020/02**  
Версія: **3**



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) для якісного визначення антитіл IgM до парвовірусу В19 в сироватці та плазмі людини**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

### А. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз (ІФА) для якісного визначення антитіл IgM до парвовірусу В19 у плазмі та сироватці людини.  
Тільки для діагностики in vitro.

### В. ВСТУП

**Вірус В19**, який зазвичай називають **парвовірусом В19**, був першим (і до 2005 року єдиним) відомим вірусом людини в родині парвовірусів, роду еритровірусів. Парвовірус В19 – це ікосаедричний вірус без оболонки, який містить одноланцюговий лінійний ДНК-геном. Його класифікують як еритровірус через здатність проникати в попередники еритроцитів у кістковому мозку. Було визнано три генотипи (з підтипами). Вірусний капсид складається з двох структурних білків, а саме VP1 (83 kD) і VP2 (53 kD). Інфекція парвовірусу В19 поширюється через дихальні виділення, а також через кров або продукти крові. Інфекція викликає легке захворювання, що характеризується еритематозним плямисто-папульозним висипом на обличчі, яке називається п'ятою хворобою або інфекційною еритемою. Це типове для дітей, а також спостерігається у дорослих. Людина зазвичай хворіє протягом 4-14 днів після зараження парвовірусом В19, але близько 20% дітей і дорослих, які інфікуються цим вірусом, не мають жодних симптомів. Інфікування під час вагітності створює ризик передачі плоду, що може призвести до водянки плоду. Зокрема, повідомляється, що наявність антитіл IgM пов'язана з гострою фазою захворювання, тоді як антитіла IgG з'являються в різних титрах незабаром після первинних інфекцій і зберігаються в крові протягом багатьох років. Люди з ослабленою імунною системою, викликану лейкемією, раком, трансплантацією органів або ВІЛ-інфекцією, піддаються ризику серйозних ускладнень від п'ятої хвороби. Це може викликати хронічну анемію, яка потребує медикаментозного лікування. Тому виявлення специфічних до парвовірусу В19 антитіл стає дуже важливим.

### С. ПРИНЦИП ТЕСТУ

Мікропланшети покриті антигенами парвовірусу В19. Тверду фазу спочатку обробляють розведеним зразком, і антигени захоплюють IgM до парвовірусу В19, якщо він присутній. Після вимивання всіх інших компонентів зразка в 2-й інкубації виявляються зв'язані анти-парвовірусні IgM шляхом додавання поліклональних специфічних антитіл до hlgM, мічених пероксидазою (HRP). Фермент, захоплений на твердій фазі, діючи на суміш субстрат/хромоген, генерує оптичний сигнал, який пропорційний кількості антитіл IgM проти парвовірусу, присутніх у зразку. Таким чином, наявність IgM у зразку можна визначити за допомогою граничного значення cut-off, здатного розрізняти негативні та позитивні зразки. Нейтралізація анти-парвовірусу IgG, що проводиться безпосередньо в лунці, виконується в аналізі, щоб блокувати перешкоди, викликані цим класом антитіл, при визначенні IgM.

### Д. КОМПОНЕНТИ

Набір містить достатньо реагентів для проведення 96 тестів.

#### 1. Мікропланшет: MICROPLATE

- 12 смужок по 8 мікролунок, покриті антигенами Парвовірусу В19. Планшети герметично запаковані разом з осушувачем.

Перед відкриттям дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури. Знову закрийте невикористані смужки в пакет з осушувачем і зберігайте при 2..8°C (°C).

- 2. Негативний контроль: CONTROL –**  
1x4.0 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання. Містить плазму людини негативну до парвовірусу В19, 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер рН 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. Містить плазму людини, позитивну до парвовірусу В19, 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Позитивний контроль має зелено-жовтий колір.
- 4. Калібратор: CAL .....**  
1 флакон. Ліофілізований реагент, щоб розчинити водою класу EIA, як зазначено на етикетці. Містить білки сироватки великої рогатої худоби, плазму людини, позитивну на парвовірус, 0.2 мг/мл (mg/ml) гентаміцину сульфату та 0.1% Катон GC як консерванти.  
**Примітка: об'єм, необхідний для розчинення вмісту флакону, може відрізнятися від партії до партії. Будь ласка, використовуйте правильний обсяг, зазначений на етикетці.**
- 5. Концентрат буферу для промивання: WASHBUF 20X**  
1x60 мл/пляшку (ml/bottle). 20-кратний концентрований розчин. Після розведення промивний розчин містить 10 мМ (mM) фосфатного буфера рН 7.0 +/-0.2, 0.05% Твін 20 і 0.045% ProClin 300.
- 6. Ферментний кон'югат: CONJ**  
2x8 мл/флакон (ml/vial). Готовий до використання розчин та кодований червоним кольором. Містить поліклональні антитіла кон'юговані з пероксидазою хрому, до IgM людини, 5% BSA, 10 мМ (mM) Трис буферу рН 6.8 +/-0.1, 0.045% ProClin 300 і 0.02% гентаміцину сульфату як консервантів.
- 7. Хромоген/Субстрат: SUBS TMB**  
1x16 мл/флакон (ml/vial). Він містить 50 мМ (mM) цитратно-фосфатного буферу, рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксид, 0.03% тетра-метил-бензидину або TMB і 0.02% перекису водню або (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
**Примітка: Зберігати захищеним від світла, чутливий до сильного освітлення.**
- 8. Сірчана кислота: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M**  
1x15 мл/пляшка (ml/vial). Містить 0.3 M розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Увага: Подразнююча речовина (H315; H319; P280; P302+P352; P332+P313; P305+P351+P338; P337+P313; P362+P363).
- 9. Розчинник для зразка: DILSPE**  
2x60 мл (ml). Містить 2% казеїн, 10 мМ (mM) На-цитрат буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Твін 20, 0.5% NP40, 0.09% азиду натрію і 0.045% ProClin 300 як консерванти. Призначений для розведення зразків.
- 10. Нейтралізуючий реагент: SOLN NEUT**  
1x8 мл/флакон (ml/vial). Містить козячий анти hlgG, 2% казеїну, 10 мМ (mM) На-цитратний буфер рН 6.0 +/-0.1, 0.1% Твін 20, 0.09% Na-азид і 0.045% ProClin 300 як консерванти.
- 11. Ущільнювальна фольга для планшету 2 шт.**
- 12. Вкладиш інструкції 1 шт.**

### Е. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

- Калібровані мікропіпетки (1000 мкл (µl), 100 мкл (µl) та 10 мкл (µl) одноразові пластикові несконечні).
- Вода класу EIA (подвійної дистиляції або деіонізації, оброблена деревним вугіллем, для видалення окислювальних хімікатів, що використовуються як дезінфікуючі засоби).
- Таймер з діапазоном 60 хвилин або вище.
- Абсорбуючі паперові серветки.

5. Калібрований мікропланшетний термостатичний інкубатор ІФА, здатний забезпечити температуру +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.

#### Г. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
3. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
4. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі, при відкритті флаконів з наборів та мікропланшетів та при проведенні тесту. Не надавайте Хромоген (ТМБ) дії сильного світла та уникайте вібрації поверхні стенду, де проводиться випробування.
5. Після отримання, зберігайте набір при температурі 2...8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
6. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекомендується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
7. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури щодо заміни набору.
8. Уникайте перехресного забруднення між зразками сироватки/плазми, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
9. Уникайте перехресного забруднення між реагентами, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них. Не використовуйте одноразові наконечники повторно.
10. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері та внутрішніх етикетках (флаконах). Дослідження, проведене на відкритому наборі, не вказало на будь-яку істотну втрату активності до шести б використань пристрою та до 3 місяців.
11. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками сироватки людини слід поводитися на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікації Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
12. Використовувати одноразовий пластиковий посуд рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
13. Відходи, що утворилися під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедури промивання, залишків контролів та зразків, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Запропоновані процедури інактивації - це обробка 10% кінцевою концентрацією побутового відбілювача протягом 16-18 годин або інактивація теплом автоклавом при 121 °C (°C) протягом 20 хв (min).
14. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
15. Сірчана кислота є подразником. У разі розливу промити поверхню великою кількістю води.
16. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків та контролів, використані мікропланшети), слід обробляти як

потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.

#### Г. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, а плазма або сироватка готуються із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу. Впливу на приготування зразка з цитратом, ЕДТА та гепарином не спостерігалось.
2. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів. Коли набір використовується для скринінгу одиниць крові, настійно рекомендується маркування зі штрих-кодом та електронне зчитування.
3. Гемолізовані (червоні) та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок або мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
4. Сироватку та плазму можна зберігати при + 2°C... + 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) протягом 12 місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморожувати більше одного разу, оскільки це може утворити частинки, які можуть вплинути на результат тесту.
5. Якщо присутні частинки, центрифугуйте при 2000 об./хв. (rpm) протягом 20 хв. (min) або краще, фільтруйте за допомогою фільтрів 0.2-0.8µ для очищення зразка перед тестуванням.

#### Н. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

##### Мікропланшет:

Перед відкриттям контейнера дайте мікропланшету нагрітися до кімнатної температури (приблизно 1 год). Перевірте, щоб осушувач не став темно-зеленим, що вказує на дефект консервації. У цьому випадку зателефонуйте в службу підтримки клієнтів Dia.Pro.

Невикористані смужки потрібно покласти назад в алюмінієвий мішечок з осушувачем, щільно застебнути на блискавку і зберігати при +2°-8°C (°C). Після першого відкриття, невикористані смужки стабільні, доки індикатор вологості всередині пакета з осушувачем не зміниться з жовтого на зелений.

##### Негативний контроль:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

##### Позитивний контроль:

Готові до використання компоненти. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

##### Калібратор:

Додайте до ліофілізованого порошку об'єм води класу ELISA, 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, весь вміст концентрованого розчину необхідно розбавити в 20 разів бідистильованою водою і обережно перемішати обертанням з денця на кришку.

Під час приготування уникайте спінювання, оскільки наявність бульбашок може вплинути на ефективність циклів миття.

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

##### Ферментний Кон'югат:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

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

##### 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.

#### Розчинник для зразків:

Готовий до використання. Перед використанням обережно перемішайте на вортексі.

#### Нейтралізуючий реагент:

Готовий до використання. Перед використанням обережно перемішайте на вортексі.

#### Сірчана кислота:

Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

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

Легенда:

Попереджувальні **H-фрази**:

**H315** - Викликає подразнення шкіри.

**H319** - Викликає серйозне подразнення очей.

Попереджувальні **P-фрази**:

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

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

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

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

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

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

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

1. Мікропіпетки повинні бути відкалібровані, щоб забезпечити правильний об'єм, необхідний для аналізу, а також проводити регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково потрапити на зразок. Їх також слід регулярно обслуговувати. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 2%. Дезактивацію розливів або залишків компонентів набору також слід проводити регулярно.
2. Інкубатор ІФА слід встановити на +37 °C (°C) (допуск +/- 0.5 °C (°C)) і регулярно перевіряти, щоб підтримувати правильну температуру. Для інкубації підходять як сухі інкубатори, так і водяні бані, за умови, що інструмент валідований для інкубації тестів ІФА.
3. **Вошер ІФА** є надзвичайно важливим для загальних показників аналізу. Вошер потрібно заздалегідь ретельно оцінити, перевірити, чи вноситься потрібний об'єм видачі, та регулярно подавати на технічне обслуговування відповідно до інструкцій виробника щодо використання. Зокрема, після закінчення щоденного навантаження вошер слід ретельно очищати від солей деіонізованою водою. Перед використанням вошер слід праймувати розведеним Промивним Розчином. Прилад слід щотижня подавати на дезактивацію згідно з його керівництвом (пропонується дезактивація 0.1 M 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 (а) пропускна здатність ≤ 10 нм (nm); (б) діапазон поглинання від 0 до ≥ 2.0; (с) лінійність до ≥ 2.0; (д) 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 інструкції 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 О «Внутрішній контроль якості». Протокол аналізу повинен бути встановлений в операційній системі пристрою та перевірений як для вошера, так і для зчитувача. Крім того, частина станції для подачі рідини (дозування та промивання) повинна бути перевірена та правильно встановлена. Особливу увагу потрібно приділити, щоб уникнути перенесення голками, що використовуються для дозування та промивання. Це потрібно вивчити та контролювати, щоб мінімізувати можливість забруднення сусідніх лунок. Рекомендується використовувати автоматизовані робочі станції ІФА, коли кількість досліджуваних зразків перевищує 20-30 одиниць за один запуск.
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. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком.
3. Переконайтеся, що Хромоген (ТМБ) безбарвний або блідо-блакитний, аспіруючи невеликий його об'єм стерильною прозорою пластиковою піпеткою.
4. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки. Переконайтеся, що алюмінієвий мішок, що містить мікропланшет, не пробитий і не пошкоджений.
5. Розведіть вміст Калібратора як описано.
6. Розведіть весь вміст 20X концентрату Промивного Розчину, як описано вище.
7. Дайте всім іншим компонентам досягти кімнатної температури (приблизно 1 год), а потім обережно перемішайте на вортексі всі рідкі реагенти.
8. Встановіть ІФА інкубатор на +37°C (°C) і підготуйте вошер ІФА, праймуючи розведеним промивним розчином, згідно з інструкціями виробника. Установіть потрібну кількість циклів промивання, як зазначено в спеціальному розділі.
9. Переконайтеся, що ІФА зчитувач увімкнено або переконайтеся, що він увімкнений принаймні за 20 хвилин до зчитування.
10. Якщо використовується автоматизована робоча станція, увімкніть, перевірте налаштування та переконайтеся, що ви використовуєте правильний протокол аналізу.
11. Переконайтеся, що мікропіпетки встановлені на необхідний об'єм.
12. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
13. У разі проблем не продовжуйте подальше тестування та повідомте керівнику.

## M. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

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

1. Розведіть зразки 1:101 у правильно визначеній пробірці для розведення (приклад: 1000 мкл (µl) Розчинника для Зразка + 10 мкл (µl) зразка). Не розбавляйте Контролі/Калібратора, оскільки вони вже готові до використання. Ретельно перемішайте всі рідкі компоненти на вортексі, а потім дійте, як описано нижче.
2. Помістіть необхідну кількість мікролунок у тримач мікролунок. Залишіть А1 лунку порожньою для бланкування.
3. Не додавати Нейтралізуючий реагент в А1, який використовується для бланкування, а також у лунки, що використовуються для Контролів та калібратора.
4. Додайте 50 мкл (µl) Нейтралізуючого реагенту у всі лунки зі зразками.

**Важлива примітка:** Нейтралізуючий реагент здатний блокувати хібнопозитивні реакції через РФ. Позитивні зразки у внутрішніх панелях контролю якості можуть бути негативними, якщо такі зразки були позитивні за допомогою IVD, який не здійснює жодної реакції блокування РФ.

- Додайте 100 мкл (µl) Негативного контролю в трьох примірниках, 100 мкл (µl) позитивного контролю одноразово, 100 мкл (µl) калібратора в двох примірниках і 100 мкл розведених зразків у кожну правильно ідентифіковану лунку.
- Інкубуйте мікропланшет при **+37 °C (°C) протягом 60 хв.**

**Важлива примітка:** Смужки повинні бути заклені клейкою герметизуючою фольгою, що входить в комплект, тільки тоді, коли тест проводиться вручну. Не накривайте смужки під час використання автоматичних інструментів IFA.

- Промийте мікропланшет автоматичним вошером, як повідомлялося раніше (розділ I.3).
- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) ферментного кон'югату в кожну лунку, крім лунки A1, і накрийте герметиком. Перевірте, щоб цей компонент червоного кольору був поданий у всі лунки, крім A1.

**Важлива примітка:** Будьте обережні, щоб не торкатися пластикової внутрішньої поверхні лунки наконечником, наповненим ферментним кон'югатом. Може відбутися забруднення.

- Інкубуйте мікропланшет **протягом 60 хв при 37°C (°C).**
- Промити мікролунки як на етапі 6.
- Внесіть піпеткою по 100 мкл (µl) суміші Хромоген/Субстрат у кожну лунку, включно з бланк-лункою. Потім інкубуйте мікропланшет при **кімнатній температурі (18-24°C (°C) протягом 20 хвилин.**

**Важлива примітка:** Не піддавайте сильному прямому освітленню. Може створюватися високий фон.

- Внесіть піпеткою 100 мкл (µl) сірчаної кислоти у всі лунки, використовуючи ту саму послідовність піпетування, що й на етапі 9. Додавання кислоти змінить позитивні калібратори, контрольну сироватку та позитивні зразки із синього на жовтий.
- Виміряйте інтенсивність кольору розчину в кожній лунці, як описано в розділі I.5, при фільтрі 450 нм (nm) (зчитування) і при 620-630 нм (nm) (віднімання фону, обов'язково), бланкуючи інструмент на A1.

#### Загальні важливі зауваження:

- Переконайтеся, що на нижній частині мікролунок немає відбитків пальців перед зчитуванням. Це може призвести до хібнопозитивних результатів при зчитуванні.
- Зчитування повинно проводитися відразу після додавання Стоп-розчину, і в будь-якому разі не довше, ніж через 20 хвилин після його додавання. Може статися деяке самоокислення хромогену, що призводить до високого фону.

#### N. СХЕМА АНАЛІЗУ

Метод	Операції
Контролі та Калібратор (*)	100 мкл (µl)
Нейтралізуючий реагент (тільки для зразків)	50 мкл (µl)
Розведені зразки 1:101	100 мкл (µl)
<b>1-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Етап промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
Ферментний кон'югат	100 мкл (µl)
<b>2-а інкубація</b>	<b>60 хв</b>
Температура	+37 °C (°C)
Крок промивання	5 циклів із 20 хв. замочування АБО 6 циклів без замочування
ТМВ/Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>	100 мкл (µl)
<b>3-я інкубація</b>	<b>20 хв</b>
Температура	КТ
Сірчана кислота	100 мкл (µl)
Зчитування ОЩ	450 нм (nm) /620-630 нм (nm)

#### (\*) Важливі примітки:

- Калібратор (CAL) не впливає на розрахунок Cut-off, крім того, він також не впливає на розрахунок результатів тесту.
- Калібратор (CAL) використовується тільки в тому випадку, якщо керівництво вимагає внутрішнього контролю якості лабораторії.

Нижче у таблиці наведено приклад схеми видачі:

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

Легенда: BLK = Бланк  
CAL = калібратор – не обов'язково  
S = Зразок

NC = Негативний контроль  
PC = позитивний контроль

#### O. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Перевірка валідації здійснюється на контролях кожного разу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи результати аналізу відповідають очікуванням та вимогам директиви IVDD 98/79/EC. Переконайтеся, що дотримані наступні параметри:

Параметр	Вимоги
Бланк-лунка	< 0.100 Значення ОЩ 450 нм (nm)
Негативний контроль	< 0.150 Середнього значення ОЩ 450 нм (nm) після бланкування Коефіцієнт варіації < 30%
Позитивний контроль	ОЩ450 нм (nm) > 1.000

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

Якщо цього не сталося, не продовжуйте далі та виконайте наступне:

Проблема	Перевірка
<b>Бланк-лунка</b> >0.100 ОЩ450 нм (nm)	1. щоб розчин Хромогену/Субстрату не був забруднений під час аналізу
<b>Негативний контроль</b> >0.150 ОЩ450 нм (nm)  Коефіцієнт варіації > 30%	1. щоб процедури промивання та налаштування вошера були підтверджені в попередньому кваліфікаційному дослідженні; 2. що був використаний відповідний миючий розчин і вошер був праймований ним перед використанням; 3. не було допущено жодної помилки в процедурі аналізу (видача позитивного контролю замість негативного); 4. що жодного забруднення негативного калібратора або лунок, не відбулося через позитивні зразки або ферментний кон'югат; 5. що мікропіпетки не були забруднені позитивними зразками або кон'югатом ферменту 6. що голки вошера не заблоковані або частково не забруднені
<b>Позитивний контроль</b> <1.000 ОЩ450 нм (nm)	1. що процедуру проведено правильно; 2. що під час дистрибуції контролю не сталося жодної помилки (наприклад: додали неправильний контроль); 3. що процедура промивання та налаштування вошера були перевірені під час попереднього кваліфікаційного дослідження;

	4. що не відбулося жодного зовнішнього забруднення позитивного контролю.
--	--

Якщо виникла будь-яка з перерахованих вище проблем, повідомте про проблему керівнику для подальших дій.

**\*\*Примітка:**

Якщо використовується Калібратор, перевірте наступні дані:

Параметр	Вимоги
Калібратор	S/Co > 1.0

Якщо результати тесту не відповідають наведеним вище вимогам, то слід діяти наступним чином:

Проблема	Перевірка
Калібратор S/Co < 1.0	1. що процедура проведена правильно; 2. що під час дистрибуції не допущено жодної помилки (напр. додали неправильний контроль); 3. що процедура миття та налаштування вошера є правильними, як було підтверджено під час попереднього кваліфікаційного дослідження; 4. що 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.

**Важлива примітка:**

Аналіз слід виконувати, як етап зчитування, описаний у розділі М, пункт 13.

**Р. РЕЗУЛЬТАТИ**

Якщо тест виявиться дійсним, результати розраховуються на основі середнього значення ОЩ450 нм (nm) / 620-630 нм (nm) негативного контролю (NC) за допомогою граничного значення cut-off (Co), визначеного за такою формулою:

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

**Важливе зауваження:** Коли обчислення результатів здійснюється за допомогою оперативної системи автоматизованої робочої станції ІФА, переконайтеся, що для отримання правильних інтерпретацій результатів використовується правильна формула.

**Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ**

Результати випробувань інтерпретуються як співвідношення значення ОЩ450 нм (nm) зразка (S) та значення cut-off (Co), або S/Co відповідно до наступної таблиці:

S/Co	Інтерпретація
< 0.9	Негативний
0.9 – 1.1	Сумнівний
> 1.1	Позитивний

Негативний результат свідчить про відсутність у пацієнта антитіл IgM до парвовірусу.

Будь-якого пацієнта, який показує неоднозначний результат, слід повторно перевірити на іншому зразку, взятому через 1-2 тижні після взяття першого зразка.

Позитивний результат свідчить про триваючу парвовірусну інфекцію, тому пацієнта слід лікувати відповідно.

**Важливі примітки:**

1. Інтерпретація результатів повинна здійснюватися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок та неправильного тлумачення.
2. Коли результати випробувань передаються з лабораторії в іншу установу, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.
3. Діагноз вірусного гепатиту має поставити і передати пацієнту лікар з відповідною кваліфікацією.

Приклад обчислення показаний нижче (дані, отримані як етап зчитування, описаний у розділі М, пункт 12):

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

Негативний контроль: 0.100 – 0.120 – 0.080 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.100 ОЩ450 нм (nm)

Нижче, ніж 0.150 – Прийнято

Позитивний контроль: 1.500 ОЩ450 нм (nm)

Вище, ніж 0.1000 – Прийнято

$$\text{Cut-off} = 0.100 + 0.250 = 0.350$$

Калібратор: 0.500 – 0.540 ОЩ450 нм (nm)

Середнє значення: 0.520 ОЩ450 нм (nm)

S/Co вище, ніж 1.0 – Прийнято

Зразок 1: 0.080 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 2: 1.800 ОЩ450 нм (nm)

Зразок 1 S/Co < 1.0 = негативний

Зразок 2 S/Co > 1.2 = позитивний

**R. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що пропонується в затвердженій настанові NCCLS C24-A2.

**1. Межа виявлення**

Європейське співтовариство досі не визначило жодного міжнародного стандарту для виявлення антитіл IgM до парвовірусу В19. За його відсутності було визначено внутрішній золотий стандарт (або IGS), щоб забезпечити постійну та хорошу чутливість пристрою.

I.G.S. розведення	PARVOM.CE Лот P1	PARVOM.CE Лот P2
1x	1.418	1.219
2x	0.804	0.665
4x	0.407	0.383
8x	0.225	0.212
Негативний контроль	0.065	0.070

**2. Діагностична чутливість та специфічність**

Діагностична чутливість була розрахована на панелі з 50 зразків, класифікованих як позитивні на IgM анти-парвовірус В19 за допомогою контрольного набору з маркуванням CE.

При використанні референсного пристрою спостерігалось значення ≥ 98%.

Діагностична специфічність була розрахована на панелі з понад 100 зразків, класифікованих як негативні за допомогою референсного пристрою.

Спостерігалось значення ≥ 98%.

Ці висновки підсумовані в наступній таблиці.

Чутливість	≥ 98%
Специфічність	≥ 98%

**3. Точність**

Її було розраховано для трьох зразків, негативного, низько- позитивного та позитивного, досліджених у 16 повторях у трьох окремих запусках для двох лотів. Результати повідомляються наступним чином:

**PARVOM.CE: лот P1**

**Негативний контроль (к-сть= 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	0.149	0.136	0.136	0.140
CV	0.013	0.018	0.018	0.016
KB%	8.5	13.0	13.0	11.5

**Низько-позитивний зразок (к-сть = 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	0.996	0.977	0.950	0.974
CV	0.032	0.057	0.056	0.048
KB%	3.2	5.8	5.9	5.0

**Позитивний контроль (к-сть= 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	3.032	2.671	3.362	3.022
СВ	0.221	0.221	0.184	0.209
КВ%	7.3	8.3	5.5	7.0

**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

**PARVOM.CE: лот Р2****Негативний контроль (к-сть= 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	0.101	0.091	0.094	0.095
СВ	0.013	0.010	0.013	0.012
КВ%	12.5	11.2	13.7	12.5

**Низько-позитивний зразок (к-сть = 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	1.227	1.261	0.970	1.153
СВ	0.085	0.085	0.090	0.087
КВ%	6.9	6.7	9.2	7.6

**Позитивний контроль (к-сть= 16)**

Середні значення	1 запуск	2 запуск	3 запуск	Середнє значення
ОЩ450 нм (nm)	3.350	2.937	3.170	3.152
СВ	0.174	0.199	0.197	0.190
КВ%	5.2	7.0	7.1	6.4

**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](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

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

**4. Достовірність**

Достовірність аналізу була перевірена за допомогою тестів на розведення та відновлення.

**Важлива примітка:**

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

**5. ОБМЕЖЕННЯ**

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

Заморожені зразки, що містять частинки фібрину або агрегати після розмороження, можуть давати дещо помилкові результати.

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.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Erik d. Heegaard, Kevin E. Brown, Clin microbiol Rev. 2002 July; 15(3): 485-505.
2. Hani O. Ghazi, J family community Med. 2007 Jan-Apr, 14(1):15-17.
3. J H Wang, W P Zhang, H X Liu, D Wang, Y F Li, W Q Wang, L Wang, F R He, Z Wang, Q G Yan, L W Chen, G S Huang Br J Cancer. 2008 February 12; 98(3): 611-618.
4. Ronald F. Lamont, Jack Sobel, Edi Vaisbuch, Juan Pedro Kusanovic, Shali Mazaki-Tovi, Sun Kwon Kim, Niels Ulbjerg, Roberto Romero, 2011 January; 118(2): 175-186.
5. Benedikt Weissbrich, Yvonne Süß-Fröhlich, Hermann J Girschick, Arthritis Res Ther. 2007; 9(4): R82.

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

