



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF	071067	Σ	96
REF	071064	Σ	192
REF	071068	Σ	480



IVD



Citiți cu atenție prezentul prospect, înainte de efectuarea testului și respectați cu strictețe instrucțiunile din cuprinsul acestuia.

Fiabilitatea rezultatelor este garantată numai cu condiția respectării stricte a acestor instrucțiuni.



Producător:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085

www.adaltis.net

ro

SIMBOLURI UTILIZATE PE ETICHETE

Română RO							
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro	Număr de catalog	Număr de lot	Atenție, citiți instrucțiunile de utilizare	Limite de temperatură	A se utiliza până la data de	Număr de test
				MICROPLATE	CONTROL+	CONTROL-	CAL
	Producător	A se feri de contactul direct cu razele soarelui	Data fabricației	Microplacă	Control pozitiv	Control negativ	Calibrator
	CONJ	DILSPE	SUBS TMB	SOLN STOP	WASH BUF 20X	DIL AS	RCNS x mL
	Conjugat	Diluant eşantioane	Substrat TMB	Soluție de stopare (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Soluție de spălare tampon concentrată 20x	Diluant pentru probe	Se reconstituie cu x mL
	Risc biologic	Pericol	Atenție				

Atenție:

Soluție de stopare clasificată ca: Skin Corr. 1A



- Avertisment:**
Pericol
- Componente periculoase ce necesită etichetare:**
Acid sulfuric
- Indicații de pericol:**
H314 – Provoacă arsuri grave ale pielii și leziuni oculare grave.
- Recomandări de siguranță:**
P260 Nu inspirați praful/fumul/gazul/aburiivaporii/spray-ul.
P303+P361 +P353 ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau cu părul): scoateți imediat toată îmbrăcămintea contaminată. Clătiți pielea cu apă/faceți un duș.
P305+P351+P338 ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți.
P310 Adresați-vă imediat unui CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau unui medic.
P405 A se depozita sub cheie.
P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu legislația în vigoare la nivel local/regional/național/internațional.

Atenție:

Controlul negativ, controlul pozitiv, calibratorul, conjugatul, diluantul pentru eşantioane, diluantul pentru probe și soluție concentrată tampon pentru spălare 20X sunt clasificate ca: Skin Sens. 1



- Avertisment:**
Atenție
- Componente periculoase ce necesită etichetare:**
Amestec de: 5-cloro-2-metil-2H-izotiazolin-3-one [Nr. CE 247-500-7]; 2-metil-2H-izotiazolin-3-one [Nr. CE 220-239-6] (3:1)
- Indicații de pericol:**
H317 Poate provoca o reacție alergică a pielii
- Recomandări de siguranță:**
P261 Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/aburiivaporii/spray-ul.
P280 Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.
P321 Trattamento specific (consultați această etichetă).
P333+P313 În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: adresați-vă medicului.
P302+P352 ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: Spălați cu apă din abundență.
P501 Eliminați conținutul/recipientul în conformitate cu legislația în vigoare la nivel local/regional/național/internațional.

Pentru Fișele cu Date de Securitate, consultați site-ul www.adaltis.net.

A. UTILIZARE

Test imuno-enzimatic (ELISA) de generația a patra, pentru detectarea anticorpilor la virusul hepatitei C, în probe de ser sau plasmă umană (EDTA, Heparină și Citrat). Trusa poate fi utilizată pentru detectarea anticorpilor din unitățile de sânge recoltate de la pacienți infectați cu virusul HCV.

Numai pentru diagnosticarea in vitro.

B. INTRODUCERE

Organizația Mondială a Sănătății (OMS) definește infecția cu virusul hepatitic C ca fiind:

”Hepatita C este o infecție virală a ficatului, denumită, înainte de 1989, până la identificarea agentului cauzator, hepatită ”non A, non B”, cu mecanism de transmitere parenteral. Descoperirea și caracterizarea virusului hepatitic C (HCV) au permis înțelegerea rolului primordial al acestuia în hepatitele post-transfuzionale și a tendinței acestuia de a induce infecții persistente”.

Virusul HCV este una din cauzele majore ale hepatitei acute și a bolilor hepatice cronice, printre care ciroză și cancer la ficat. La nivel global, sunt infectate cu virusul HCV, estimativ, 170 de milioane de persoane, iar între 3 spre 4 milioane de persoane sunt nou infectate în fiecare an. Cele mai frecvente cauze de transmitere a virusului HCV la nivel mondial sunt transfuziile de unități de sânge necontrolate serologic, precum și folosirea, de la o persoană la alta, a acelor și seringilor care nu au fost corect sterilizate. În prezent nu există niciun vaccin disponibil pentru prevenirea hepatitei C, iar tratamentul hepatitelor C cronice este prea costisitor, pentru ca populațiile din țările în curs de dezvoltare să și-l poată permite. Așadar, dintr-o perspectivă globală, cel mai mare impact asupra bolnavilor de hepatită C constă în focalizarea eforturilor asupra reducerii riscurilor de transmitere a virusului HCV pe cale nozocomială (ex.: transfuzii de sânge, injecții nesigure) și asupra reducerii comportamentelor de risc (ex.: injectarea de droguri).

Virusul hepatitei C (HCV) este unul dintre virușii (A, B, C, D și E) ce sunt responsabili de cele mai multe dintre cazurile de hepatită virală. Este un virus ARN încapsulat monocatenar, din familia Flaviviridae, ce are un spectru restrâns de gazde. Oamenii și cimpanzeii reprezintă singurele specii cunoscute ca fiind susceptibile la infecția cu virusul HCV și ambele specii dezvoltă boli similare. O caracteristică importantă a virusului o reprezintă relativa mutabilitate a genomului, legată probabil de o tendință marcată (80%) de a induce infecții cronice. Virusul HCV este reunit în mai multe genotipuri diverse, ce pot fi importante în determinarea gravității bolii și a răspunsului la tratament.

Perioada de incubatie a infecției cu virusul HCV, înainte de manifestarea simptomelor clinice, variază de la 15 la 150 de zile. În infecțiile acute, simptomele cele mai frecvente sunt oboseala și icterul; în orice caz, majoritatea cazurilor (un procent cuprins între 60% și 70%), inclusiv cele ce dezvoltă o infecție cronică, sunt asimptomatice. Aproximativ 80% dintre noii pacienți infectați dezvoltă o infecție cronică. Cirroza apare la un procent cuprins aproximativ între 10% și 20% dintre pacienții cu infecție cronică, în timp ce cancerul hepatic apare la un procent cuprins între 1% și 5% dintre persoanele care prezintă o infecție cronică, pe o perioadă de timp cuprinsă între 20 și 30 de ani. Majoritatea pacienților ce suferă de cancer hepatic fără a

fi infectați cu virusul hepatitei B, prezintă infecție cu virusul HCV. Mecanismul prin care infecția cu virusul HCV cauzează cancerul hepatic nu este încă foarte clar. Hepatita C accentuează gravitatea bolilor ficatului, atunci când se manifestă concomitent cu alte probleme hepatice. Mai precis, bolile ficatului evoluează mai rapid, la persoanele cu boli hepatice cauzate de consumul de alcool și de infecția cu virusul HCV. Virusul HCV se transmite în principal prin contactul direct cu sângele infectat. Transmiterea virusului HCV prin transfuziile de sânge necontrolate serologic în vederea depistării prezenței virusului, folosirea, de la o persoană la alta, a acelor, seringilor și a altor echipamente medicale care nu au fost corespunzător sterilizate, sau schimbul de ace între consumatorii de droguri, este foarte documentată. Transmiterea se poate produce și pe cale sexuală sau perinatală, însă nu la fel de frecvent. Alte modalități de transmitere, ce țin de practici comportamentale, sociale, culturale (body piercing, circumcizii și tatuaje) sunt de asemenea posibile, dacă se utilizează instrumente care nu au fost corespunzător sterilizate. Virusul HCV nu se transmite pe calea strănutului, prin îmbrățișări, tuse, mâncare sau apă, dacă se folosesc aceleași tacâmuri sau pahare, sau prin contact întâmplător.

Atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, grupurile de risc includ consumatorii de droguri injectabile, primitorii de sânge necontrolat serologic, persoanele care suferă de hemofilie, pacienții dializați și persoanele cu numeroși parteneri sexuali, ce practică raporturi sexuale neprotejate. În țările dezvoltate, se estimează că 90% dintre persoanele infectate cu virusul hepatitei C cronice sunt în principal consumatori de droguri injectabile și persoane cărora li s-au administrat transfuzii de sânge necontrolat serologic, sau transfuzii de derivate din sânge. În majoritatea țărilor în curs de dezvoltare, unde se utilizează încă sânge și derivate din sânge neanalizate, principala cale de transmitere a infecției o reprezintă instrumentele pentru injecții nesterilizate și transfuziile de sânge necontrolate serologic. De asemenea, persoanele care practică ritualuri de sacrificare și circumcizii sunt persoane cu risc, dacă folosesc sau refolosesc instrumente metalice nesterilizate.

OMS estimează că aproximativ 170 de milioane de persoane, adică 3% din populația globului, sunt infectate cu virusul HCV și prezintă riscul de a se îmbolnăvi de ciroză și/sau cancer hepatic. Prevalența infecției cu virusul HCV în Africa, Orientul Mijlociu, Asia de Sud-Est și Pacificul de Nord este mult mai mare, față de America de Nord și de Europa.

Testele diagnostice pentru HCV se utilizează pentru a preveni infecțiile prin screening-ul donatorilor de sânge și plasmă, pentru stabilirea diagnosticului clinic și pentru o mai bună luare a deciziilor privind tratamentul administrat unui pacient. Testele diagnostice disponibile în prezent se bazează pe dozări imuno-enzimatice (EIA) pentru detectarea unor anticorpi specifici HCV. Sistemul EIA poate depista peste 95% dintre pacienții cu infecții cronice, dar numai între 50% și 70% dintre infecțiile acute. Analiza RIBA (metoda recombinată de imunoblot) de identificare a anticorpilor care reacționează cu antigene individuale HCV se utilizează adesea ca test suplimentar pentru confirmarea unui rezultat pozitiv obținut prin teste EIA. Teste pentru HCV bazate pe amplificarea acizilor ribonucleici (de ex. PCR, probă cu ADN legat) au fost utilizate atât pentru confirmarea rezultatului serologic, cât și pentru stabilirea eficacității tratamentului antiviral folosit. Un rezultat pozitiv indică prezența infecției active și posibilitatea de extindere a

infecției și/sau de dezvoltare a unor boli cronice ale ficatului.
Medicamentele antivirale, cum ar fi interferonul, administrat ca atare sau împreună cu ribavirina, se pot utiliza pentru tratamentul pacienților cu hepatită C cronică, însă acest tratament este foarte costisitor. Tratamentul ce constă doar în administrarea interferonului este eficient la aproximativ 10-20% dintre pacienți. Interferonul administrat împreună cu ribavirina este eficient la 30-50% dintre pacienți. În schimb, se pare că ribavirina, administrată ca atare, nu este eficientă.

Nu există niciun vaccin eficient împotriva virusului HCV. Cercetările continuă, însă mutabilitatea accentuată a genomului virusului HCV îngreunează descoperirea unui vaccin eficient. De asemenea, și lipsa cunoștințelor privind un eventual răspuns imuno-protector, ulterior infecției cu virusul HCV, încetinește descoperirea vaccinului. Nici măcar nu se știe dacă sistemul imunitar este în stare să elimine virusul.

În orice caz, câteva studii au demonstrat prezența unor anticorpi ce neutralizează virusul, la pacienții infectați cu virusul HCV. În lipsa unui vaccin, trebuie adoptate toate măsurile de precauție pentru a preveni infecția, inclusiv (a) teste screening, testele de sânge și a organelor donate; (b) dezactivarea virusului în plasmă și produse derivate; (c) dezvoltarea și consolidarea practicilor de control al infecției în protocoalele de acțiune sanitară, precum și o corectă sterilizare a instrumentelor medicale și stomatologice; (d) promovarea unor schimbări în relațiile dintre oamenii de rând și operatorii sanitari, pentru a reduce utilizarea excesivă a injecțiilor și pentru practicarea unor injecții sigure; (e) reducerea riscului pentru persoanele consumatoare de droguri și cele ce utilizează practici sexuale de mare risc”.

Genomul codifică pentru componentele structurale, o proteină nucleocapsidică și două glicoproteine de suprafață și componentele funcționale implicate în replicarea virusului și în procesarea proteinelor acestuia. Regiunea de codificare nucleocapsidică pare a fi cea mai conservatoare, dintre probele izolate obținute în întreaga lume.

C. PRINCIPIUL TESTULUI

Microplăcile sunt tapetate cu antigene HCV specifice derivate din regiunile "core" și "ns" de codificare pentru antigenele conservatoare și determinanții antigenici imunodominanți (peptida de bază, NS3 recombinant, peptide NS4 și NS5).

Faza solidă este tratată mai întâi cu eșantionul diluat și, anticorpii HCV, dacă sunt prezenți, se vor lega la antigenele fixate. După etapa de îndepărtare prin spălare a tuturor celorlalte componente ale eșantionului, în cea de-a doua fază de incubare, după legarea anticorpilor HCV, anticorpii IgG și IgM sunt detectați prin adăugarea conjugatului cu anticorpi specifici policlonali anti-IgG&M, marcați cu peroxidază (HRP).

Enzima captată pe faza solidă, reacționând cu amestecul substrat TMB, generează un semnal optic care este proporțional cu cantitatea de anticorpi anti-HCV prezenți în eșantion. O valoare cut-off permite să se interpreteze densitățile optice în rezultate pozitive și negative de anticorpi HCV.

D. COMPONENTE

Trusa conține reactivi pentru 96 de teste (cod 071067), 192 de teste (cod 071064), sau 480 de teste (cod 071068).

Microplacă	1
Control negativ	1x4 mL/fiolă
Control pozitiv	1x2 mL/fiolă
Calibrator	2 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	1x50 mL/fiolă
Conjugat	1x16 mL/fiolă
Diluant pentru eșantioane	1x50 mL/fiolă
Substrat TMB	1x16 mL/fiolă
Soluție de stopare	1x15 mL/fiolă
Diluant pentru probe	1x8 mL/fiolă
Hârtie de sigilare placă	2
Număr de teste	96
Cod	071067

Microplacă	2
Control negativ	2x4 mL/fiole
Control pozitiv	1x4 mL/fiolă
Calibrator	3 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	2x50 mL/fiole
Conjugat	2x16 mL/fiole
Diluant pentru eșantioane	2x50 mL/fiole
Substrat TMB	2x16 mL/fiole
Soluție de stopare	2x15 mL/fiole
Diluant pentru probe	2x8 mL/fiole
Hârtie de sigilare placă	4
Număr de teste	192
Cod	071064

Microplacă	5
Control negativ	1x20 mL/fiolă
Control pozitiv	1x10 mL/fiolă
Calibrator	7 fiole
Soluție de spălare tampon concentrată 20x	5x50 mL/fiole
Conjugat	2x40 mL/fiole
Diluant pentru eșantioane	5x50 mL/fiole
Substrat TMB	2x40 mL/fiole
Soluție de stopare	2x40 mL/fiole
Diluant pentru probe	1x40 mL/fiolă
Hârtie de sigilare placă	10
Număr de teste	480
Cod	071068

1. Microplacă

12 strip-uri de 8 minigodeuri tapetate cu peptidă Core, antigen recombinant NS3, peptide NS4 și NS5. Plăcile sunt sigilate în folie din aluminiu cu absorbant de umezeală.

Așteptați ca microplaca să ajungă la temperatura mediului ambiant (18...24°C) înainte de a deschide folia. Strip-urile nefolosite trebuie reintroduse la loc în folia cu absorbant de umezeală și trebuie păstrate la o temperatură de 2...8°C.

2. Control negativ

Control gata de utilizare. Conține 10 mM soluție tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1, proteină de bază 2% cazeină și conservant 0.1% Proclin 150. Controlul negativ este colorat în culoarea verde măsliniu.

3. Control pozitiv

Control gata de utilizare. Conține proteine din ser de capră în procent de 1%, anticorpi umani pozitivi la virusul

HCV, 10 mM tampon citrat de Na cu pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% azidă de sodiu și conservant 0.1% Proclin 150. Controlul pozitiv este colorat în culoarea verde închis.

Notă importantă: Lipsa agenților patogeni vitali în soluția de control pozitiv nu poate fi garantată în totalitate, prin urmare reactivul trebuie tratat ca fiind potențial infectat, în conformitate cu principiile de bună practică de laborator.

4. Calibrator

Calibrator liofilizat. Se va dizolva în cantitatea de apă distilată cu aviz EIA indicată pe etichetă. Conține proteine din ser de fetus de vițel, anticorpi umani pozitivi la virusul HCV, cu conținut calibrat după codul NIBSC Working Standard 06/188-006, 10mM de tampon citrat de Na cu pH 6.0±0.1, 0.3 mg/mL sulfat de gentamicină și conservant 0.1% Proclin 150.

Notă importantă: Lipsa agenților patogeni vitali în calibrator nu poate fi garantată în totalitate, prin urmare reactivul trebuie tratat ca fiind potențial infectat, în conformitate cu principiile de bună practică de laborator.

Note: volumul necesar pentru dizolvarea conținutului fiolei poate varia de la un lot la altul. Vă rugăm să utilizați volumul corespunzător, indicat pe etichetă.

5. Soluție de spălare tamponconcentrată 20x

Soluție concentrată 20X. După diluare, soluția de spălare (tampon de spălare diluat) conține 10 mM tampon fosfat cu pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 și 0.05% Proclin 150. După diluare, soluția de spălare rămâne stabilă timp de 1 săptămână, la temperaturi între 2...8°C.

6. Conjugat

Reactiv gata de utilizare, colorat în culoarea roșie. Conține peroxidază de hrean conjugată cu anticorpi policlonali de capră cu IgG și IgM umani, 5% BSA, 10 mM tampon Citrat cu pH 6.4 ± 0.1 și conservanți 0.1% Proclin și 0.05% Tween 20.

7. Substrat TMB

Componentă gata de utilizare. Conține 50 mM soluție tampon citrat-fosfat cu pH 3.5-3.8, 4% dimetil sulfoxid, 0.03% tetrametilbenzidină (TMB) și 0.02% peroxid de hidrogen (H₂O₂). Amestecați ușor, înainte de utilizare.

Notă: A se păstra ferit de lumina directă, deoarece este sensibil la surse de lumină puternice.

8. Diluant pentru probe

Componentă gata de utilizare. Conține ser de capră, 10 mM soluție tris tampon cu pH 8.0±0.1 ce conține 0.1% Proclin 150 și 0.09% azidă de sodiu pentru pre-tratarea eșantioanelor și a soluțiilor de control de pe placă, cu stoparea interferențelor.

9. Soluție de stopare

Componentă gata de utilizare.

Conține o soluție 0.3 M de H₂SO₄. Amestecați ușor, înainte de utilizare.

10. Diluant eșantion

Componentă gata de utilizare, colorată în culoarea verde închis. Conține 1% cazeină, 10 mM tampon citrat de Na cu pH 6.0 ± 0.1 și conservant 0.1% Proclin 150.

A se utiliza pentru diluarea eșantionului.

Notă: Diluantul își schimbă culoarea din verde măsliniu, în verde închis-albastru, în prezența eșantionului.

E. MATERIALE NECESARE, DAR NEINCLUSE ÎN TRUSĂ

1. Micropipete calibrate (200 µL și 10 µL) și vârfuri de unică folosință.
2. Apă distilată cu aviz EIA (bidistilată sau deionizată, tratată cu cărbune activ pentru îndepărtarea oxidanților chimici folosiți ca dezinfectanți).
3. Cronometru cu interval de timp de 60 minute sau mai mult.
4. foi de hârtie absorbantă.
5. Incubator termostatic calibrat pentru microplăci ELISA, ce poate asigura o temperatură de +37°C.
6. Cititor calibrat de microplăci ELISA, cu capacitate de citire la 450 nm, prevăzut dacă este posibil cu filtre de 620-630 nm pentru detectarea blank-ului și filtre de 405 nm.
7. Spălător calibrat pentru microplăci ELISA.
8. Mixer vortex sau alte dispozitive asemănătoare pentru centrifugare.

F. AVERTISMENTE ȘI PRECAUȚII

1. Această trusă poate fi utilizată doar de personal tehnic specializat și corespunzător calificat, sub supravegherea medicului șef de laborator. Citiți cu atenție prezentul prospect, înainte de dozare și respectați cu strictețe instrucțiunile din cuprinsul acestuia.
2. Citiți cu atenție Fișa cu Date de Securitate (SDS), înainte de a efectua dozarea.
3. În cazul utilizării trusei pentru screening-ul unor unități de sânge și componente ale sângelui, acesta va trebui să fie utilizată într-un laborator certificat și autorizat de autoritatea națională responsabilă în domeniu (Ministerul Sănătății sau un organism similar), în vederea efectuării acestui tip de analize.
4. Întreg personalul implicat în executarea probei trebuie să fie echipat cu îmbrăcăminte de protecție de laborator, mănuși din latex fără talc și ochelari de protecție. Utilizarea oricăror dispozitive ascuțite (ace) sau tăioase (lame) este interzisă. Întreg personalul implicat trebuie să fie instruit cu privire la procedurile de siguranță personală, conform recomandărilor Centrului pentru Controlul Bolilor Atlanta, SUA, indicate în publicația Autorității Naționale pentru Sănătate: "Siguranță personală în Laboratoarele de Microbiologie și Biomedicină", ediția 1984.
5. Întreg personalul implicat în manipularea eșantioanelor trebuie să fie vaccinat împotriva virusurilor HBV și HAV, pentru care există vaccinuri sigure și eficiente.
6. Încăperea laboratorului trebuie să aibă un mediu controlat, pentru a se evita contaminarea cu praf sau cu agenți microbiologici din aer, în momentul deschiderii fiolelor și al microplăcii din trusă și în momentul efectuării testului. Substrat (TMB) trebuie ferit de lumina puternică. După începerea testului, evitați vibrațiile mesei de lucru.
7. După recepționarea trusei, aceasta trebuie păstrată la o temperatură de 2...8°C, într-un frigider sau într-o cameră rece, cu temperatură controlată.
8. Nu folosiți componente din truse aparținând unor loturi diferite. Nu se recomandă folosirea componentelor din două truse aparținând aceluiași lot.
9. Asigurați-vă că reactivii sunt limpezi și că nu conțin microorganisme sau particule de mari dimensiuni.

Dacă reactivii nu îndeplinesc aceste condiții, anunțați imediat responsabilul de laborator, pentru a demara procedurile necesare în vederea schimbării trusei.

10. Evitați contaminările încrucișate între eșantioane de ser/plasmă, folosind vârfuri de unică folosință, pe care să le înlocuiți la fiecare eșantion.
11. Evitați contaminările încrucișate între reactivii din trusă, folosind vârfuri de unică folosință pe care să le înlocuiți la fiecare componentă în parte.
12. Nu folosiți trusa după expirarea termenului de valabilitate a acesteia, tipărit pe cutie și pe eticheta aplicată pe fiecare fiolă în parte.
13. Toate eșantioanele trebuie considerate ca fiind potențial infectate. Toate serurile umane trebuie manipulate conform prevederilor Nivelului 2 de Bio-Siguranță, urmând recomandările Centrului pentru Controlul Bolilor Atlanta, SUA, precum și cele din cuprinsul publicației Autorității Naționale pentru Sănătate: "Bio-Siguranță în Laboratoarele de Microbiologie și Biomedicină", ediția 1984.
14. Pentru prepararea componentelor lichide, sau pentru componentele mutate pe stațiile de testare automatizate, se recomandă folosirea de recipiente din plastic de unică folosință, în felul acesta evitându-se contaminările încrucișate.
15. Deșeurile rezultate în urma folosirii trusei se vor elimina conform prevederilor legislației în vigoare la nivel național și ale legislației în materie de deșuri rezultate din substanțe chimice și biologice de laborator. Mai precis, scurgerile de lichide, rezultate în urma procedurii de spălare, resturile de soluții de control și resturile de soluții eșantion trebuie considerate ca fiind potențial infectate și trebuie supuse procedurii de inactivare, înainte de a fi eliminate. Se recomandă procedura de inactivare prin tratarea cu o soluție de hipoclorit de sodiu cu concentrație de 10% timp de 16-18 ore sau dezactivarea la cald, în autoclavă, la 121°C timp de 20 minute.
16. Scurgerile accidentale de soluții eșantion, în timpul efectuării testelor, trebuie absorbite cu foi de hârtie înmuiate în hipoclorit de sodiu, iar apoi trebuie clătite cu apă. Ulterior, respectivele foi de hârtie se vor arunca într-un recipient special pentru deșuri provenite din materiale biologice.
17. Soluția de stopare conține 0,3 M acid sulfuric. Evitați contactul acesteia cu pielea și ochii. În caz de contact, clătiți imediat și abundent cu apă.
18. Eliminarea soluțiilor reactive ce conțin azidă de sodiu sau thimerosal, drept conservanți, trebuie tratate conform prevederilor și legislației în vigoare în materie, în țara în care se utilizează testul. Eliminarea soluțiilor ce conțin azidă de sodiu prevede utilizarea unor mari cantități de apă de la robinet. Rețineți faptul că azida de sodiu poate forma compuși explozivi, în urma contactului prelungit cu plumbul sau cuprul.
19. Nu fumați, nu mâncați și nu aplicați produse cosmetice în zonele în care sunt manipulate eșantioanele și reactivii.
20. Celelalte deșuri produse în urma utilizării trusei (de exemplu: vârfurile folosite pentru controale și eșantioane, microplăcile folosite) trebuie să fie manipulate ca și cum ar fi potențial infectate și trebuie colectate conform prevederilor legislației în vigoare la nivel național și ale legislației privind eliminarea deșeurilor de laborator.
21. Nu pipetați substanțele cu gura.

G. EȘANTIOANE: PREPARARE ȘI RECOMANDĂRI

1. Sângele se recoltează din venă prin metode aseptice, iar plasmă și serurile se prepară prin folosirea tehnicilor standard de preparare a eșantioanelor pentru analize clinice de laborator. Nu s-a depistat nicio influență, în cazul preparării eșantionului cu citrat, EDTA sau heparină.
2. Nu adăugați niciun fel de conservanți în eșantioane; evitați mai ales azida de sodiu, deoarece aceasta poate influența activitatea enzimatică a conjugatului, determinând obținerea unor rezultate fals negative.
3. Eșantioanele trebuie să fie clar identificate cu coduri sau nume, pentru a se evita confuziile în interpretarea rezultatelor. În cazul în care trusa se utilizează pentru teste screening ale unor unități de sânge, recomandăm insistent etichetarea acestora cu coduri de bare ce se vor citi cu un cititor electronic.
4. Eșantioanele intens hemolizate (roșii) sau lipemice (lăptoase) trebuie aruncate, deoarece pot duce la obținerea unor rezultate false. Eșantioanele ce conțin resturi de fibrină sau cheaguri și corpuri microbiologice trebuie aruncate, deoarece pot duce la obținerea unor rezultate false.
5. Serurile și plasmă se vor păstra la temperaturi de +2...+8°C cel mult cinci zile după recoltare. Pentru conservarea acestora pe perioade mai îndelungate de timp, eșantioanele pot fi congelate la -20°C timp de câteva luni. Niciun eșantion congelat nu poate fi congelat și decongelat decât o singură dată, deoarece acest proces generează particule ce pot compromite rezultatul testului.
6. În cazul în care eșantionul conține particule, centrifugați la o viteză de 2.000 rpm timp de 20 minute, sau filtrați cu filtre de 0.2-0.8μm pentru a curăța eșantionul ce trebuie testat.

H. PREPARAREA COMPONENTELOR ȘI AVERTISMENTE

Studiile efectuate pe o trusă deschisă nu au demonstrat nicio pierdere semnificativă de activitate la cel mult 1 reutilizare a aceluiași material, în termen de 6 luni.

1. Microplăci:

Așteptați până când microplaca ajunge la temperatura mediului ambiant (cel puțin 1 oră) înainte de a deschide folia. Verificați dacă absorbantul de umezeală nu și-a schimbat culoarea în verde închis, ceea ce ar indica o conservare deficitară a trusei. În astfel de situații, adresați-vă serviciului clienți din cadrul firmei Adaltis. Strip-urile nefolosite trebuie introduse la loc în folie, cu tot cu absorbantul de umezeală. Folia se va sigila perfect și se va păstra la temperaturi de 2...+8°C. După prima deschidere, strip-urile rămase vor fi stabile până când indicatorul de umezeală din interiorul foliei cu absorbant de umezeală își va schimba culoarea din galben în verde.

2. Control negativ:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

3. Control pozitiv:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Această componentă trebuie tratată ca și cum ar fi potențial infectată.

4. Calibrator:

Dizolvați cu atenție conținutul liofilizat al fiolei cu cantitatea de apă distilată cu aviz EIA, indicată pe etichetă. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

Această componentă trebuie tratată ca și cum ar fi potențial infectată.

Notă: După dizolvare, calibratorul nu este stabil. Păstrați în părți egale, la temperaturi de -20°C .

5. Soluție de spălare concentrată 20x

(flacon de 50 mL):

Întreaga cantitate de soluție concentrată 20x se va dizolva cu apă biodistilată, până la 1000 ml (volumul este indicat pe etichetă) și se va amesteca ușor, înainte de utilizare. Deoarece soluția poate să conțină formațiuni cristaline, aveți grijă să dizolvați întreaga cantitate. În timpul preparării, evitați producerea spumei, deoarece prezența bulelor poate compromite eficiența fazei de spălare.

Notă: După diluare, soluția de spălare rămâne stabilă timp de 1 săptămână, la $+2.8^{\circ}\text{C}$.

6. Conjugat:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Aveți grijă să nu contaminați lichidul cu oxidanți chimici, pulberi sau microbi prezenți în aer. Dacă este necesară mutarea acestei componente, folosiți exclusiv recipiente din plastic, pe cât posibil sterilizate.

7. Substrat TMB:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare. Aveți grijă să nu contaminați lichidul cu oxidanți chimici, pulberi sau microbi prezenți în aer. A se feri de lumină puternică, agenți oxidanți și suprafețe metalice. Dacă este necesară mutarea acestei componente, folosiți exclusiv recipiente din plastic, pe cât posibil sterilizate.

8. Diluant pentru probă:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

9. Soluție de stopare:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

10. Diluant pentru eșantion:

Gata de utilizare. Centrifugați în vortex, înainte de utilizare.

I. INSTRUMENTAR UTILIZAT ÎMPREUNĂ CU TRUSA

1. Micropipetele trebuie să fie gradate, pentru a picura cantitatea corectă necesară pentru probă și este obligatorie o decontaminare regulată (cu spirt medicinal, înălbitor 10%, soluție dezinfectantă de uz spitalicesc) a acelor componente care pot intra accidental în contact cu eșantionul. Acestea trebuie să fie în permanență controlate, pentru a se asigura o precizie de 1% și o corectitudine de $\pm 2\%$. La intervale regulate de timp, este obligatorie o dezinfectare a stropilor sau reziduurilor de componente din set.
2. Incubatorul ELISA trebuie să fie setat la 37°C (cu o toleranță de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) și trebuie să fie verificat cu regularitate, pentru a se asigura menținerea unei temperaturi corecte. Pentru incubare se pot utiliza atât incubatoarele pe uscat, cât și băile de apă, dacă dispozitivele sunt omologate pentru incubarea testelor ELISA.

3. Spălătorul ELISA este extrem de important pentru efectuarea cu succes a probei. Spălătorul trebuie să fie omologat și trebuie să fie corect optimizat. De regulă, sunt suficiente 4-5 cicluri de spălare (aspirare + distribuire a unei cantități de 350 μL de soluție de spălare = 1 ciclu) pentru ca proba să permită obținerea unui rezultat corect. Se recomandă un interval de timp de înmuiere de 20-30 secunde, între cicluri. Pentru a stabili corect numărul acestora, se recomandă să se efectueze un test de probă cu soluțiile de control din trusă și cu eșantioane de referință clar stabilite ca fiind pozitive sau negative și să se verifice conformitatea cu valorile indicate mai jos, în secțiunea O "Control de calitate intern". Operațiunile de gradare corectă a volumului distribuit și de întreținere a spălătorului (decontaminare și curățare a acelor) se vor efectua conform instrucțiunilor producătorului.
4. Timpii de incubare au o toleranță de $\pm 5\%$.
 - ✓ Metodă de incubare de scurtă durată (pentru prima/a 2-a incubare, toleranța este cuprinsă între 43 min. și 47 min.; pentru cea de-a 3-a incubare, toleranța este cuprinsă între 14 și 16 min.).
 - ✓ Metodă de incubare standard (pentru prima incubare, toleranța este cuprinsă între 57 min. și 63 min.; pentru cea de-a 2-a și cea de-a 3-a incubare, toleranța este cuprinsă între 29 și 31 min.).
5. Cititorul de microplăci ELISA trebuie să fie prevăzut cu un filtru de citire la 450nm și, pe cât posibil, și cu un al doilea filtru (620-630nm) pentru operațiunile de blank. Densitatea optică la 450 nm mai mare decât liniaritatea cititorului, poate fi citită la 405 nm și înmulțită cu factorul de conversie. Performanțele sale standard trebuie să fie (a) amplitudine de bandă $\leq 10\text{nm}$; (b) interval de absorbție de la 0 la ≥ 2.0 ; (c) liniaritate ≥ 2.0 ; (d) repetabilitate $\geq 1\%$. Blank-ul este determinat în godeul descris în secțiunea "Procedură de efectuare a probei". Sistemul optic al cititorului trebuie să fie corect etalonat, pentru a asigura o măsurare corectă a densității optice. Efectuați cu regularitate operațiunile de întreținere, conform instrucțiunilor producătorului.
6. Atunci când se utilizează o stație automată pentru truse ELISA, toate etapele critice (distribuie, incubare, spălare, citire, manipulare a datelor) trebuie să fie atent verificate, etalonate și corect desfășurate, în vederea menținerii conformității cu valorile indicate în secțiunile O "Control de calitate intern". Protocolul probei trebuie să fie instalat în sistemul de operare al unității și trebuie să fie validat și pentru spălător și cititor. De asemenea, partea stației ce realizează manipularea componentelor lichide (distribuie și spălare) trebuie să fie validată și corect setată. O atenție deosebită se va acorda evitării transferului prin intermediul acelor utilizate pentru distribuie și spălare. Acesta trebuie să fie studiat și controlat, în vederea minimizării pericolului de contaminare a godeurilor alăturate. Utilizarea unor stații automate ELISA este recomandată pentru testele screening de sânge, atunci când numărul de eșantioane ce trebuie testate este de peste 20-30 unități pe tură.

L. CONTROALE ȘI OPERAȚIUNI PREMERGĂTOARE PROBEI

1. Verificați termenul de valabilitate al trusei, tipărit pe eticheta aplicată pe cutie. Nu folosiți trusa, dacă termenul de valabilitate este expirat.
2. Verificați componentele lichide, acestea nu trebuie să fie contaminate cu particule sau microorganisme vizibile cu ochiul liber. Asigurați-vă că substratul TMB este incolor sau de culoarea bleu pal, aspirând o cantitate mică din acesta cu o pipetă sterilă din plastic transparent. Verificați dacă ambalajul nu s-a rupt în timpul transportului și dacă nu s-au produs scurgeri de lichide în interiorul cutiei. Verificați ca folia de aluminiu, în care se află microplaca, să nu fie găurită sau deteriorată.
3. Diluați întreg conținutul soluției concentrate de spălare 20x, conform instrucțiunilor de mai sus.
4. Dizolvați calibratorul, conform instrucțiunilor de mai sus.
5. Așteptați până când toate componentele trusei ajung la temperatura camerei (aproximativ 1 oră) și apoi amestecați conform instrucțiunilor.
6. Setări incubatorul ELISA la +37°C și pregătiți spălătorul ELISA amorsându-l cu soluția de spălare diluată, conform instrucțiunilor producătorului. Setări numărul corect de cicluri de spălare, conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Asigurați-vă că cititorul ELISA este pornit de cel puțin 20 de minute, înainte de a efectua citirea.
8. Dacă se utilizează o stație automată, porniți stația, verificați setările acesteia și asigurați-vă că utilizați protocolul corect.
9. Controlați dacă micropipetele au fost setate la volumul prevăzut.
10. Asigurați-vă că aveți la îndemână toate instrumentele necesare, gata de a fi utilizate.
11. În cazul sesizării unor probleme, nu continuați derularea testului, ci informați persoana responsabilă.

M. PROCEDURĂ DE EFECTUARE A PROBEI

Proba trebuie efectuată conform instrucțiunilor de de mai jos, având grijă să se păstreze aceeași incubare, pentru toate eșantioanele ce trebuie testate.

Proba se poate efectua prin două proceduri de incubare. Alegeți-o pe cea mai potrivită, conform regulamentelor în vigoare:

1. Incubare standard (prima incubare 60 minute, a 2-a și a 3-a incubare 30 minute)
2. Incubare de scurtă durată (prima și a 2-a incubare 45 minute, a 3-a incubare 15 minute)

1. Incubare standard - Probă manuală:

1. Introduceți numărul corect de godeuri în suportul respectiv. Lăsați primul godeu gol, pentru blank.
2. Adăugați 200 μ L de control negativ în trei godeuri, 200 μ L de calibrator în două și 200 μ L de control pozitiv într-un singur godeu. Nu diluați controalele și calibratorul, deoarece sunt deja diluate și gata de utilizare!
3. Adăugați 200 μ L de diluant pentru eșantioane în toate godeurile eșantioanelor; adăugați apoi 10 μ L de eșantion în fiecare godeu corespunzător identificat. Agitați ușor placa, având grijă să evitați revărsarea și contaminarea godeurilor alăturate, pentru a dizolva complet eșantionul în diluantul acestuia.

Notă importantă: Asigurați-vă că diluantul pentru eșantion, după adăugarea eșantionului, își schimbă culoarea din verde deschis în verde-albastru închis, pentru a semnala adăugarea eșantionului.

4. Adăugați 50 μ L de diluant pentru probă în toate godeurile cu soluții de control/calibrator și cu eșantioane. Verificați dacă eșantioanele își schimbă culoarea în albastru închis.
5. Incubați microplaca timp de **60 min la +37°C**.
Notă importantă: Strip-urile trebuie să fie sigilate cu hârtia adezivă specială din dotare, numai atunci când testul este efectuat manual. Nu acoperiți strip-urile, dacă se folosește un dispozitiv ELISA automat.
6. Spălați microplaca într-un spălător automat, distribuind și aspirând 350 μ L/godeu de soluție de spălare diluată conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Pipetați 100 μ L de conjugat enzimatic în toate godeurile, cu excepția celui pentru blank și apoi sigilați cu hârtie adezivă. Asigurați-vă că ați adăugat această componentă de culoare roșie în toate godeurile, cu excepția A1.

Notă importantă: Aveți grijă să nu loviți peretele intern din plastic al godeului, cu vârful plin cu conjugat. Se pot produce contaminări.

8. Incubați microplaca timp de **30 min la +37°C**.
9. Spălați godeurile, urmând instrucțiunile din secțiunea I.3.
10. Pipetați 100 μ L de amestec substrat TMB în fiecare godeu, inclusiv în cel pentru Blank. Incubați microplaca **la temperatura mediului ambiant (18-24°C) timp de 30 minute**.

Notă importantă: Amestecul trebuie ferit de lumina directă puternică. Lumina puternică poate genera fundaluri accentuate.

11. Pipetați 100 μ L de soluție de stopare în fiecare godeu, folosind aceeași ordine de pipetare descrisă la punctul 10, pentru a bloca reacția enzimatică. La adăugarea soluției de stopare, controlul pozitiv și eșantioanele pozitive își vor schimba culoarea, din albastru în galben.
12. Măsurați intensitatea culorii soluției din fiecare godeu, conform instrucțiunilor din secțiunea 1.5, cu un filtru de citire optică la 450 nm și dacă este posibil cu un filtru de citire optică la 620-630 nm pentru blank-ul din godeul A1 de pe microplacă.

Note importante:

1. Dacă nu aveți la dispoziție cel de-al doilea filtru de citire optică, asigurați-vă că nu există amprente digitale pe fundalul microplăcii, înainte de citirea optică la 450 nm. Astfel de amprente pot determina obținerea unor rezultate fals pozitive.
2. Citirea optică trebuie efectuată imediat după adăugarea soluției de stopare și, în orice caz, în maxim 20 de minute de la adăugarea acesteia. Este posibil să apară o ușoară auto-oxidare a substratului, cu generarea unui rezultat cu fundal accentuat.
3. Centrifugarea la 350 $\pm$ 150 rpm în timpul incubării determină o creștere a sensibilității de dozare, cu circa 20%.

2. Incubare de scurtă durată - Probă manuală:

1. Introduceți numărul corect de godeuri în suportul respectiv. Lăsați primul godeu gol, pentru blank.
2. Adăugați 200 µL de control negativ în trei godeuri, 200 µL de calibrator în două și 200 µL de control pozitiv într-un singur godeu. Nu diluați controalele și calibratorul, deoarece sunt deja diluate și gata de utilizare!
3. Adăugați 200 µL de diluant pentru eșantioane în toate godeurile eșantioanelor; adăugați apoi 10 µL de eșantion în fiecare godeu corespunzător identificat. Agitați ușor placa, având grijă să evitați revărsarea și contaminarea godeurilor alăturate, pentru a dizolva complet eșantionul în diluantul acestuia.

Notă importantă: Asigurați-vă că diluantul pentru eșantion, după adăugarea eșantionului, își schimbă culoarea din verde deschis în verde-albastru închis, pentru a semnaliza adăugarea eșantionului.

4. Adăugați 50 µL de diluant pentru probă în toate godeurile cu soluții de control/calibrator și cu eșantioane. Verificați dacă eșantioanele își schimbă culoarea în albastru închis.
5. Incubați microplaca timp de **45 min la +37°C**.
Notă importantă: Strip-urile trebuie să fie sigilate cu hârtia adezivă specială din dotare, numai atunci când testul este efectuat manual. Nu acoperiți strip-urile, dacă se folosește un dispozitiv ELISA automat.
6. Spălați microplacă într-un spălător automat, distribuind și aspirând 350 µL/godeu de soluție de spălare diluată conform instrucțiunilor din secțiunea I.3.
7. Pipetați 100 µL de conjugat enzimatic în toate godeurile, cu excepția celui pentru blank și apoi sigilați cu hârtie adezivă. Asigurați-vă că ați adăugat această componentă de culoare roșie în toate godeurile, cu excepția A1.

Notă importantă: Aveți grijă să nu loviți peretele intern din plastic al godeului, cu vârful plin cu conjugat. Se pot produce contaminări.

8. Incubați microplacă timp de **45 min la +37°C**.
9. Spălați godeurile, urmând instrucțiunile din secțiunea I.3.
10. Pipetați 100 µL de amestec substrat TMB în fiecare godeu, inclusiv în cel pentru Blank. Incubați microplacă la temperatura mediului ambiant (18-24°C) timp de **15 minute**.

Notă importantă: Amestecul trebuie ferit de lumina directă puternică. Lumina puternică poate genera fundaluri accentuate.

11. Pipetați 100 µL de soluție de stopare în fiecare godeu, folosind aceeași ordine de pipetare descrisă la punctul 10, pentru a bloca reacția enzimatică. La adăugarea soluției de stopare, controlul pozitiv și eșantioanele pozitive își vor schimba culoarea, din albastru în galben.
12. Măsurăți intensitatea culorii soluției din fiecare godeu, conform instrucțiunilor din secțiunea 1.5, cu un filtru de citire optică la 450 nm și dacă este posibil cu un filtru de citire optică la 620-630 nm pentru blank-ul din godeul A1 de pe microplacă.

Note importante:

1. Dacă nu aveți la dispoziție cel de-al doilea filtru de citire optică, asigurați-vă că nu există amprente

digitale pe fundalul microplăcii, înainte de citirea optică la 450 nm. Astfel de amprente pot determina obținerea unor rezultate fals pozitive.

2. Citirea optică trebuie efectuată imediat după adăugarea soluției de stopare și, în orice caz, în maxim 20 de minute de la adăugarea acesteia. Este posibil să apară o ușoară auto-oxidare a substratului, cu generarea unui rezultat cu fundal accentuat.
3. Centrifugarea la 350 ± 150 rpm în timpul incubării determină o creștere a sensibilității de dozare, cu circa 20%.

N. SCHEMĂ PROBĂ

Metodă	Operațiuni (Incubare Standard)	Operațiuni (Incubare de scurtă durată)
Soluții de control & Calibrator	200 µL	200 µL
Diluant pentru eșantioane și Eșantion	200 µL diluant+ 10 µL eșantion	200 µL diluant+ 10 µL eșantion
Diluant pentru probe	50 µL	50 µL
Prima incubare	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatură	+37°C	+37°C
Spălare	4-5 cicluri	4-5 cicluri
Conjugat enzimatic	100 µL	100 µL
A 2-a incubare	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatură	+37°C	+37°C
Spălare	4-5 cicluri	4-5 cicluri
Substrat TMB	100 µL	100 µL
A 3-a incubare	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatură	Temperatură mediu ambiant (18...24°C)	Temperatură mediu ambiant (18...24°C)
Soluție de stopare	100 µL	100 µL
Citire DO	450/620nm	450/620nm

Mai jos vă prezentăm un exemplu de schemă de distribuție (valabil pentru ambele proceduri de incubare):

Microplacă

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	E2										
B	CN	E3										
C	CN	E4										
D	CN	E5										
E	CAL	E6										
F	CAL	E7										
G	CP	E8										
H	E1	S9										

Legendă: BLK = Blank CN = Control Negativ
CAL = Calibrator CP = Control Pozitiv E = Eșantion

O. CONTROL DE CALITATE INTERN

Se va efectua un control de validare asupra soluțiilor de control și calibratorului, ori de câte ori se utilizează trusa, pentru a se verifica dacă performanțele probei sunt în conformitate atât cu valorile de DO 450/620nm, cât și cu valorile așteptate, indicate în tabelul de mai jos:

Verificați	Cerințe
Godeu blank	< 0.100 DO 450/620nm valoare
Control negativ (CN)	< 0.050 valoare medie DO450/620nm după extragerea blank-ului
Calibrator	S/Co >1.1
Control pozitiv	>1.000 DO450/620nm valoare

Dacă rezultatele testului corespund cerințelor de mai sus, treceți la secțiunea următoare.

În caz contrar, nu treceți mai departe și efectuați următoarele verificări:

Probleme	Verificați
Godeu blank > 0.100 DO450nm	1. dacă soluția substrat nu s-a contaminat în timpul probei
Control Negativ (CN) > 0.050 DO450nm după extragerea blank-ului	1. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 2. dacă s-a utilizat soluția corectă de spălare și dacă spălătorul a fost amorsat înainte de utilizare; 3. dacă nu s-a comis vreo eroare în procedura de efectuare a probei (adăugarea de soluție de control pozitiv, în locul celei de control negativ); 4. dacă nu s-a produs vreo contaminare a soluției de control negativ sau a godeurilor acestuia, din cauza unor stropi de soluție de control pozitiv sau de conjugat enzimatic; 5. dacă micropipetele nu s-au contaminat cu eșantioane pozitive sau cu conjugat enzimatic; 6. dacă acele spălătorului nu sunt blocate sau parțial înfundate.
Calibrator S/Co < 1.1	1. dacă procedurile au fost executate corect; 2. dacă nu a apărut nicio eroare în timpul adăugării acestuia (de ex. adăugarea de soluție de control negativ în locul calibratorului); 3. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 4. dacă nu s-a produs nicio contaminare externă a calibratorului.
Control pozitiv <1.000 DO450nm	1. dacă procedurile au fost executate corect; 2. dacă nu s-a comis nicio eroare în timpul adăugării controlului (adăugare de soluție de control negativ, în locul controlului pozitiv). În astfel de situații, controlul negativ va indica o DO 450nm > 0.150 3. dacă procedura de spălare și setările spălătorului au fost setate conform studiilor de precalificare; 4. dacă nu s-a produs nicio contaminare externă a controlului pozitiv

În cazul în care a apărut una dintre problemele de mai sus, anunțați responsabilul, pentru a se decide modul de acțiune.

P. REZULTATE

Rezultatele testului sunt calculate pe baza unei valori medii de cut-off stabilită cu ajutorul formulei de mai jos:

Cut-Off (Co) = valoare absorbantă medie CN (control negativ) + 0.350

Valoarea determinată pentru test se va utiliza pentru interpretarea rezultatelor, conform instrucțiunilor din paragraful următor.

Q. INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele testului se vor interpreta ca raport dintre valoarea DO 450 nm a eșantionului și valoarea Cutt-off (sau S/Co), pe baza următorului tabel:

S/Co	Interpretare
< 0.9	Negativ
0.9 - 1.1	Invalid
> 1.1	Pozitiv

Un rezultat negativ indică faptul că pacientul nu este infectat cu virusul HCV, sau că unitatea de sânge poate fi utilizată pentru transfuzie.

Pentru pacienții în cazul cărora rezultatul testului este invalid, va fi necesară repetarea testului, cu un eșantion prelevat după 1-2 săptămâni. Unitatea de sânge nu va putea fi utilizată pentru transfuzie.

Un rezultat pozitiv indică prezența infecției cu virusul HCV, prin urmare pacientul trebuie să fie supus tratamentului aferent, iar unitatea de sânge trebuie distrusă.

Note importante:

1. Interpretarea rezultatelor se va face exclusiv sub supravegherea șefului de laborator, pentru a se reduce riscul unor erori de analiză.
2. Orice rezultat pozitiv trebuie să fie confirmat printr-o metodă alternativă, în măsură să detecteze anticorpii IgG și IgM (teste de confirmare), înainte de pronunțarea unui diagnostic de hepatită virală.
3. După cum am indicat în evaluarea performanțelor produsului, această analiză este în măsură să detecteze seroconversia la anticorpi anti-HCV core, înaintea unor alte truse din comerț. Așadar, un rezultat pozitiv, neconfirmat, obținut cu aceste truse din comerț, nu trebuie să fie exclus, ca rezultat fals pozitiv! În orice caz, eșantionul trebuie supus și unui test de confirmare.
4. Din moment ce proba este în măsură să determine și anticorpii de clasă IgM, este posibil să apară neconcordanțe cu alte produse din comerț, pentru detectarea anticorpilor anti-HCV, ce nu conțin conjugat anti IgM. Pozitivitatea reală a eșantionului pentru anticorpii HCV trebuie să fie confirmată ulterior, examinându-se și reactivitatea IgM, importantă pentru diagnosticarea infecției cu virusul HCV.
5. Atunci când rezultatele sunt transmise de la laborator către un sistem electronic, aveți grijă să nu transmiteți date greșite.
6. Diagnosticul de hepatită virală trebuie să fie stabilit și comunicat pacientului doar de personal medical calificat.

În continuare vă prezentăm un exemplu de calcul:

Datele de mai jos nu trebuie folosite în locul datelor reale, obținute de către utilizator.

Control negativ: 0.019 – 0.020 – 0.021 DO450nm

Valoare medie: 0.020 DO450nm Mai mică de 0.050 – Acceptat

Control pozitiv: 2.189 DO450nm

Peste 1.000 – Acceptat

Cut-Off = $0.020 + 0.350 = 0.370$
 Calibrator: 0.550 - 0.530 DO450nm
 Valoare medie: 0.540 DO450nm S/Co = 1.4
 S/Co peste 1.1 – Acceptat

Eșantion 1: 0.070 DO450nm
 Eșantion 2: 1.690 DO450nm
 Eșantion 1 S/Co < 0.9 = negativ
 Eșantion 2 S/Co > 1.1 = pozitiv

R. PERFORMANȚELE TESTULUI

Evaluarea performanțelor testului s-a realizat conform prevederilor Specificațiilor Tehnice Comune (CTS) (art. 5, Capitolul 3 din Directiva 98/79/CE) și s-a efectuat pentru ambele proceduri de incubare (standard și de scurtă durată).

1. LIMITE DE DETECTARE

Limita de detectare a probei a fost calculată folosindu-se procedura de incubare de scurtă durată, conform prevederilor Standardului de Lucru Britanic pentru detectarea anticorpilor anti-HCV, NIBSC cod 06/188-006. Tabelul de mai jos cuprinde valorile medii de DO450nm prevăzute de acest standard, diluat în plasmă negativă și apoi analizat.

Diluare	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	3,50	4,00	4,30
2 X	2,10	2,60	2,60
4 X	1,3	1,40	1,30
Plasmă Negativă	0,25	0,20	0,20

De asemenea, s-a analizat "in toto" eșantionul codificat Accurun 1 - seria 3000 – pus la dispoziție de Boston Biomedica Inc., USA și s-au obținut următoarele rezultate:

Accurun 1 series	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Factor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SPECIFICITATE ȘI SENSIBILITATE DE DIAGNOSTIC

Analiza performanței trusei s-a realizat printr-o testare externă, efectuată pe un număr de peste 5000 de eșantioane.

2.1 Specificitatea diagnosticului

Reprezintă probabilitatea ca proba să dea un rezultat negativ, în lipsa unei probe de analizat specifice. Au fost examinați peste 5000 de donatori aleatori, inclusiv donatori pentru prima dată.

Specificitatea diagnosticului a fost verificată cu un test omologat US FDA.

Au fost testați 5043 donatori și s-a obținut o specificitate de 99.5%.

210 pacienți spitalizați au fost testați pentru HCV; s-a obținut o specificitate a diagnosticului de 99.5%. De asemenea, specificitatea diagnosticului a fost verificată și prin testarea unui număr de 162 eșantioane potențial interferente (cu alte boli infecțioase, anticorpi pozitivi E.coli, pacienți cu boli hepatice nevirale, pacienți supuși dializei, femei însărcinate, eșantioane intens hemolizate, lipemice etc.). S-a obținut o valoare a specificității de 100%.

Nu s-a observat nicio falsă reactivitate determinată de metoda de preparare a eșantioanelor. Atât plasmele, derivate prin diferite tehnici standard de preparare (citrut, EDTA și heparină), cât și serurile au fost utilizate pentru stabilirea valorilor de specificitate. Au fost testate eșantioane congelate, pentru a se verifica eventualele interferențe determinate de recoltare și conservare. Nu s-a depistat nicio interferență.

2.2 Sensibilitate de diagnostic

Reprezintă probabilitatea ca proba să dea un rezultat pozitiv, în lipsa unei probe de analizat specifice. Sensibilitatea de diagnostic a fost verificată extern, pe un număr total de 348 eșantioane; s-a obținut o sensibilitate de diagnostic de 100%. Intern, au fost testate peste 50 de eșantioane pozitive, obținându-se și de această dată o sensibilitate de diagnostic de 100%.

Au fost testate eșantioane pozitive la infecții provocate de alte genotipuri decât HCV.

Mai mult de atât, s-au studiat majoritatea panelurilor de sero-conversie puse la dispoziție de Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) și Zeptometrix, USA, (HCV).

Mai jos vă prezentăm rezultatele pentru unele dintre acestea.

Panel	Nr. eșantioane	Adaltis ¹	Ortho ^{1,2}
PHV 901	11	9	9
PHV 904	7	2	4
PHV 905	9	3	4
PHV 906	7	7	7
PHV 907	7	3	2
PHV 908	13	10	8
PHV 909	3	2	2
PHV 910	5	3	3
PHV 911	5	3	3
PHV 912	3	1	1
PHV 913	4	2	2
PHV 914	9	5	5
PHV 915	4	3	0
PHV 916	8	4	3
PHV 917	10	6	6
PHV 918	8	2	0
PHV 919	7	3	3
PHV 920	10	6	6
HCV 10039	5	2	0
HCV 6212	9	6	7
HCV 10165	9	5	4

Notă:

1. Eșantioane pozitive
2. HCV v.3.0

De asemenea, produsul a fost testat pe panelul EFS Ac HCV, lot nr. 06.140817, produs de Etablissement Francais Du Sang (EFS), Franța, obținându-se următoarele rezultate:

Panel EFS Ac HCV

Eșantion	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Rezultate așteptate
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativ
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitiv
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitiv
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitiv
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitiv
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitiv

3. PRECIZIE

A fost calculată pe cinci eșantioane, unul negativ și patru pozitive, examinate prin 4 replicări, fiecare în șase runde separate.

S-au obținut următoarele rezultate:

Rezultate în cadrul aceluiași lot: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul lot (procedură incubare de scurtă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	S/Co Medie	În interiorul Probei	Între Probe	Total
Negativ	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitive	1.20	8.52	8.49	12.03
	1.51	7.69	12.22	14.44
	3.57	7.43	11.82	13.97
	11.87	3.42	9.32	9.92

Rezultate în cadrul aceluiași lot: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul lot (procedură incubare de lungă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	S/Co Medie	În interioru l Probei	Între probe	Total
Negativ	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitive	1.47	9.62	11.40	14.92
	1.82	8.92	12.77	15.58
	4.31	4.59	12.88	13.67
	13.78	2.42	8.96	9.26

Rezultate între loturi: Trusă EIAGEN HCV Ab (v.4) -

Primul, al 2-lea și al 3-lea lot (procedură incubare de scurtă durată)

		Precizie - %CV		
Eșantion	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negativ	8,65	8,29	6,13	
Calibrator	4,98	4,44	5,38	
Pozitiv	4,11	3,11	1,37	

Variabilitatea indicată în tabele nu s-a soldat cu erori de clasificare a eșantioanelor.

S. SUGESTII PENTRU SOLUȚIONAREA PROBLEMELOR

Respectarea strictă a procedurii și a specificațiilor, precum și o corectă utilizare a reactivilor și o distribuire corectă permit e

vitarea următoarelor tipuri de erori:

EROARE	CAUZE POSIBILE / SUGESTII
DO foarte diferite (± 50%) față de cele indicate în CC	-reactivi aplicați în cantități eronate (sugestie: verificați conformitatea dintre cantitatea setată în pipete și cea prevăzută de test, etalonați din nou) -temperatură eronată sau timp de incubare eronat (sugestie: o întreținere mai atentă a incubatorului, notați ora de începere a incubării) -eroare în executarea fazelor de spălare și de citire fotometrică (sugestie: verificați corecta funcționare sau setările respectivelor dispozitive) -contaminarea substratului sau a conjugatului (sugestie: folosiți numai recipiente curate din plastic de unică folosință)
Repetabilitate redusă a rezultatelor	-reactivii și eșantioanele au fost aplicați în cantități care nu sunt constante (sugestie: verificați precizia pipetelor și conformitatea dintre cantitatea aplicată și cea prevăzută de test; etalonați din nou) -eroare în executarea fazelor de spălare sau de citire (sugestie: verificați corecta funcționare sau setările respectivelor dispozitive) -contaminarea substratului (sugestie: folosiți numai recipiente curate din plastic de unică folosință) -murdărirea sau degradarea reactivilor (sugestie: folosiți vârfuri adecvate, recipiente curate din plastic de unică folosință și apă distilată sau un produs echivalent)
Nicio reacție colorimetrică, după adăugarea substratului	-unii reactivi nu au fost adăugați -contaminare accentuată a conjugatului sau a substratului -executare greșită a procedurii de testare (de ex. aplicare accidentală a reactivilor într-o ordine greșită, sau din recipientul greșit etc.)
Reacție prea puțin intensă (DO prea mici)	-timp de incubare prea scurt, temperatură de incubare prea joasă -diluare eronată a conjugatului
Reacție prea intensă (DO prea mari)	-diluare eronată a conjugatului -timp de incubare prea lung, temperatură de incubare prea ridicată -calitate proastă a apei folosite pentru soluția de spălare (grad redus de deionizare) -spălare insuficientă (conjugatele nu au fost corect îndepărtate)
Rezultate inexplicabile	-contaminarea pipetelor, a vârfurilor sau a recipientelor -spălarea nu este constantă sau nu este suficientă (conjugatele nu au fost corect îndepărtate)
%CV în interiorul probei prea ridicat	-reactivii și/sau strip-urile nu au ajuns la temperatura camerei, înainte de utilizare -spălătorul pentru microplăci nu spală corect (sugestie: curățați capul spălătorului)
%CV între probe prea ridicat	-condițiile de incubare nu sunt constante (durată, temperatură) -controalele și eșantioanele nu au fost adăugate în același timp (cu aceleași pauze) (verificați ordinea de adăugare) -modificări cauzate de personalul operator

T. AUTOMATIZARE

Procedura descrisă în prezentul prospect cu instrucțiuni de utilizare se referă exclusiv la testul efectuat prin metoda manuală. În cazul utilizării unor sisteme de analiză automate, se vor urma instrucțiunile din cuprinsul manualelor de utilizare ale respectivelor dispozitive. Fiecare laborator trebuie să respecte propriile proceduri de validare internă, pentru a atesta conformitatea cu sistemele automatizate.

U. RESTRICȚII

Procentul de repetabilitate a unor rezultate fals pozitive, neconfirmate de analiza RIBA de confirmare, sau de alte metode similare, a fost stabilit ca fiind de sub 0,1% din populația normală.

Eșantioanele congelate ce conțin particule de fibrină sau cheaguri după congelare au dus la obținerea unor rezultate fals pozitive.

BIBLIOGRAFIE

1. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
2. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26:62S-5S.
3. McQuillan GM, Alter MJ, Moyer LA, Lambert SB, Margolis HS. A population based serologic study of hepatitis C virus infection in the United States. In Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL, Verme G, eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turin, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, ed. *Digestive diseases in the United States: epidemiology and impact*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Washington, DC: US Government Printing Office, 1994; NIH publication no. 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN, et al. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 1990;264:2231-35.
6. Alter HJ, Holland PV, Purcell RH, et al. Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. *Ann Intern Med* 1972;77:691-9.
7. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Feinstone SM, Morrow AG, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet* 1975;2:838-41.
8. Seeff LB, Wright EC, Zimmerman HJ, McCollum RW, VA Cooperative Studies Group. VA cooperative study of post-transfusion hepatitis and responsible risk factors. *Am J Med Sci* 1975;270:355-62.
9. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975;292:767-70.
10. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
11. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989;244:362-4.
12. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989;321:1494-1500.
13. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991;325:1325-9.
14. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson, FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. *N Engl J Med* 1992;327:1899-1905.
15. Alter, MJ. Epidemiology of hepatitis C in the west. *Semin Liver Dis* 1995;15:5-14.
16. Donahue JG, Nelson KE, Muñoz A, et al. Antibody to hepatitis C virus among cardiac surgery patients, homosexual men, and intravenous drug users in Baltimore, Maryland. *Am J Epidemiol* 1991;134:1206-11.
17. Zeldis JB, Jain S, Kuramoto IK, et al. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhoo MI, Jasinski DR, Sullivan JT. Prevalence of hepatitis C in a chemically dependent population. *Arch Intern Med* 1993;153:2025-30.
19. Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty, MC, Nelson, KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Pub Health* 1996;86:655-61.
20. Brettler DB, Alter HJ, Deinstag JL, Forsberg AD, Levine PH. Prevalence of hepatitis C virus antibody in a cohort of hemophilia patients. *Blood* 1990;76:254-6.
21. Troisi CL, Hollinger FB, Hoots WK, et al. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL, et al. Serologic markers of viral hepatitis A, B, C, and D in patients with hemophilia. *J Med Virology* 1993;41:205-9.
23. Tokars JI, Miller ER, Alter MJ, Arduino MJ. National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 1995. *ASAIO Journal* 1998;44:98-107.
24. Osmond DH, Charlebois E, Sheppard HW, et al. Comparison of risk factors for hepatitis C and hepatitis B virus infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1993;167:66-71.
25. Weinstock HS, Bolan G, Reingold AL, Polish LB: Hepatitis C virus infection among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *JAMA* 1993;269:392-4.
26. Thomas DL, Cannon RO, Shapiro CN, Hook EW III, Alter MJ. Hepatitis C, hepatitis B, and human immunodeficiency virus infections among non-intravenous drug-using patients attending clinics for sexually transmitted diseases. *J Infect Dis* 1994;169:990-5.
27. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, Liu J, O'Malley PM, Alter, MJ. Hepatitis C virus infection in sexually active homosexual men. *J Infect* 1994;29:263-9.
28. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore--an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995;171:768-75.
29. Thomas DL, Factor SH, Kelen GD, Washington AS, Taylor E Jr, Quinn TC. Viral hepatitis in health care personnel at The Johns Hopkins Hospital. *Arch Intern Med* 1993;153:1705-12.
30. Cooper BW, Krusell A, Tilton RC, Goodwin R, Levitz RE. Seroprevalence of antibodies to hepatitis C virus in high-risk hospital personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:82-5.
31. Abdel-Hamid, M., M. El-Day, S. El-Kafrawy, N. Mikhail, G.T. Strickland, and A.D. Fix. 2002. Comparison of second- and third-generation enzyme immunoassays for detecting antibodies to hepatitis C virus. *J. Clin. Microbiol.* 40:1656-1659.
32. Dusheiko, G., H. Schlimovitz-Weiss, D. Brown, F. McOmish, P.-L. Yap, S. Sherlock, N. McIntyre, and P. Simmonds. 1994. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19:13-18.
33. Gretch, D. Diagnostic tests for hepatitis C. The article can be found at: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. It was written as part of a National Institute of Health Conference on Hepatitis C, held from March 24-26, 1997 in Bethesda Maryland
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli, and E. Silini. 1994. Hepatitis C virus (HCV) core serotype in chronic HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32:2523-2527.
35. Ohno, T., M. Mizokami, R.-R. Wu, M.G. Saleh, K.-I. Ohba, E. Orito, M. Mukaide, R. Williams, and J.Y.N. Lau. 1997. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for the identification of HCV genotype 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 35:201-207.
36. Takada, N., S. Takase, N. Enomoto, A. Takada, and T. Date. 1992. Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genome. *J. Hepatol.* 14:35-40.
37. Yoshioka, K., S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishikawa, Y. Itoh, M. Takayanagi, Y. Higashi, M. Shibata, and T. Morishima. 1992. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16:293-299.