



STATEMENT

We, ACON Laboratories, Inc., having a registered office at *5850 Oberlin Drive #340, San Diego, CA 92121* authorize SRL Sanmedico having a registered office at *A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chisinău, MD-2012, Moldova*

to register, notify, renew or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

Date: March 18, 2024

Signature:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Xie", is written over a horizontal line.

Qiyi Xie, Md, MPH
V.P. of Regulatory & Clinical Affairs
ACON Laboratories, Inc.



Certificate

No. Q5 104507 0001 Rev. 03

Holder of Certificate: **ACON Laboratories, Inc.**
5850 Oberlin Drive, #340
San Diego CA 92121
USA

Certification Mark:



Scope of Certificate: **Design and Development, Manufacture and distribution of In Vitro Diagnostic Test Kits and Reagents for the Determination of Infectious Diseases, Clinical Chemistry, Drugs of Abuse, Tumor/Cardiac Marker, Fertility/Pregnancy and Blood Glucose Monitoring System, Lancing Devices and Lancets**

The Certification Body of TÜV SÜD Product Service GmbH certifies that the company mentioned above has established and is maintaining a quality management system, which meets the requirements of the listed standard(s). All applicable requirements of the testing and certification regulation of TÜV SÜD Group have to be complied with. For details and certificate validity see: [www.tuvsud.com/ps-cert?q=cert:Q5 104507 0001 Rev. 03](http://www.tuvsud.com/ps-cert?q=cert:Q5_104507_0001_Rev._03)

Report No.: SH22743A01

Valid from: 2022-09-15
Valid until: 2025-09-06

Date, 2022-09-15



Christoph Dicks
Head of Certification/Notified Body

Certificate

No. Q5 104507 0001 Rev. 03

Applied Standard(s):

EN ISO 13485:2016
Medical devices - Quality management systems -
Requirements for regulatory purposes
(ISO 13485:2016)
DIN EN ISO 13485:2016

Facility(ies):

ACON Laboratories, Inc.
5850 Oberlin Drive, #340, San Diego CA 92121, USA

Address holder for registration only

ACON Laboratories, Inc.
10125 Mesa Rim Road, San Diego CA 92121, USA

Manufacture and distribution of
In Vitro Diagnostic Test Kits and Reagents for the Determination of
Infectious Diseases, Clinical Chemistry, Drugs of Abuse,
Tumor/Cardiac Marker, Fertility/Pregnancy and Blood Glucose
Monitoring System, Lancing Devices and Lancets

ACON Laboratories, Inc.
6865 Flanders Dr., Suite B, San Diego CA 92121, USA

Storage of
In Vitro Diagnostic Test Kits and Reagents for the Determination of
Infectious Diseases, Clinical Chemistry, Drugs of Abuse,
Tumor/Cardiac Marker, Fertility/Pregnancy and Blood Glucose
Monitoring System, Lancing Devices and Lancets

AZURE Institute, Inc.
10125 Mesa Rim Road, San Diego CA 92121, USA

Design and Development of
In Vitro Diagnostic Test Kits and Reagents for the Determination of
Infectious Diseases, Clinical Chemistry, Drugs of Abuse,
Tumor/Cardiac Marker, Fertility/Pregnancy and Blood Glucose
Monitoring System, Lancing Devices and Lancets

Acon Laboratories Inc.
Guerrero Negro 9942 Parque Industrial Pacifico IV, 22644
Tijuana B.C. CP, MEXICO

Manufacture of
blood glucose test strips, antigen rapid test and IgG/IgM antibody
rapid test for infectious disease.



EC Certificate

Full Quality Assurance System

Directive 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Devices (IVDD), Annex IV excluding (4, 6)
(List A and B and devices for self-testing)

No. V1 104507 0003 Rev. 06

Manufacturer: **ACON Laboratories, Inc.**
5850 Oberlin Drive, #340
San Diego CA 92121
USA

Product Category(ies): **Blood glucose measuring systems for self testing
and self-testing devices for clinical chemistry,
hematology and pregnancy and ovulation**

The Certification Body of TÜV SÜD Product Service GmbH declares that the aforementioned manufacturer has implemented a quality assurance system for design, manufacture and final inspection of the respective devices / device families in accordance with IVDD Annex IV. This quality assurance system conforms to the requirements of this Directive and is subject to periodical surveillance. For marketing of List A devices an additional Annex IV (4) certificate is mandatory. All applicable requirements of the testing and certification regulation of TÜV SÜD Group have to be complied with. For details and certificate validity see: www.tuvsud.com/ps-cert?q=cert:V1_104507_0003_Rev.06

Report no.: SH22743EXT01

Valid from: 2022-05-04

Valid until: 2025-05-26

Date, 2022-05-04

Christoph Dicks
Head of Certification/Notified Body



EC Certificate

Full Quality Assurance System

Directive 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Devices (IVDD), Annex IV excluding (4, 6)
(List A and B and devices for self-testing)

No. V1 104507 0003 Rev. 06

Model(s):

On Call Plus Blood Glucose Monitoring System,
On Call Plus Blood Glucose Test Strips,
On Call EZ II Blood Glucose Monitoring System,
On Call Advanced Blood Glucose Monitoring System,
On Call Advanced Blood Glucose Test Strips,
On Call Chosen Blood Glucose Test Strips,
On Call Vivid Blood Glucose Monitoring System (OGM-101),
On Call Vivid Blood Glucose Test Strips (OGS-101),
On Call Sharp Blood Glucose Monitoring System (OGM-121),
On Call Sharp Blood Glucose Test Strips (OGS-121)
On Call Plus II Blood Glucose Monitoring System (OGM-171),
On Call Plus II Blood Glucose Test Strips (OGS-171),
On Call Extra Blood Glucose Monitoring System (OGM-191),
On Call Extra Blood Glucose Test Strips (OGS-191),
On Call GK Dual Blood Glucose & Ketone Monitoring System (OGM-161),
On Call Blood Ketone Test Strips (OGS-161),
Urinalysis Reagent Strips (Urine),
UTI Urinary Tract Infection Test Strips,
Cholesterol Monitoring System (CCM-111),
CHOL Total Cholesterol Test Devices (CCS-111),
TRIG Triglycerides Test Devices (CCS-112),
HDL High Density Lipoprotein Test Devices (CCS-113),
3-1 Lipid Panel Test Devices (CCS-114),
Cholesterol CTRL Control Devices,
Cholesterol Monitoring System (CCM-101),
CHOL Total Cholesterol Test Strips (CCS-101),
PT/INR Monitoring System (CCM-151),
PT/INR Test Strips (CCS-151),
Hemoglobin Testing System (CCM-141),
Hemoglobin Test Strips (CCS-141),
hCG Pregnancy Rapid Test Cassette (Urine),
Pregnancy Rapid Test Midstream,
On Call Extra Mobile Blood Glucose Monitoring System (OGM-281),
On Call Sure Blood Glucose Monitoring System (OGM-211),
On Call Sure Sync Blood Glucose Monitoring System (OGM-212),
On Call Sure Blood Glucose Test Strips (OGS-211),
GIMA Blood Glucose Monitoring System,
GIMA Bluetooth Blood Glucose Monitoring System,
GIMA Blood Glucose Test Strips,
On Call GU Dual Blood Glucose & Uric Acid Monitoring



EC Certificate

Full Quality Assurance System

Directive 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Devices (IVDD), Annex IV excluding (4, 6)
(List A and B and devices for self-testing)

No. V1 104507 0003 Rev. 06

System (OGM-201),
On Call Blood Uric Acid Test Strips (OGS-201),
LH Ovulation Rapid Test Cassette (Urine),
Ovulation Rapid Test Midstream,
Ovulation & Pregnancy Test Combo Pack,
On Call Extra Voice Blood Glucose Monitoring System
(OGM-291),
Early Detection Pregnancy Test,
Digital Pregnancy Test,
Go-Keto Blood Glucose & Ketone Monitoring System (OGM-
161),
Go-Keto Blood Ketone Test Strips (OGS-161),
Go-Keto Blood Glucose Test Strips,
On Call Extra GM Blood Glucose Monitoring System(OGM-
191),
On Call Extra GM Blood Glucose Test Strips (OGS-191),
On Call Plus GM Blood Glucose Monitoring System,
On Call Plus GM Blood Glucose Test Strips,
Go-Keto Urinalysis Reagent Strips

Facility(ies):

ACON Laboratories, Inc.
5850 Oberlin Drive, #340, San Diego CA 92121, USA

ACON Laboratories, Inc.
10125 Mesa Rim Road, San Diego CA 92121, USA

AZURE Institute, Inc.
10125 Mesa Rim Road, San Diego CA 92121, USA

Acon Laboratories Inc.
Guerrero Negro 9942 Parque Industrial Pacifico IV, 22644 Tijuana
B.C. CP, MEXICO

Declaration of Conformity

ACON Laboratories, Incorporated
5850 Oberlin Drive #340
San Diego, CA 92121, USA

**We, the manufacturer, declare under our sole responsibility that the
in vitro diagnostic device:**

Mission[®] Urinalysis Reagent Strips (U031-XX1)

classified as Others in the directive 98/79/EC,

**meets all the provisions of the directive 98/79/EC on *in vitro* diagnostic
medical devices which apply to it**

**The self-declaration is according to Annex III
(excluding Section 6) of the Directive.**

Authorized Representative:
Medical Device Safety Service GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany

Signed this 11 day of February, 2020
in San Diego, CA USA



Qiyi Xie, MD, MPH
Senior Staff, Regulatory Affairs & Clinical Affairs
Acon Laboratories, Inc.



Mission® Urinalysis Reagent Strips and Urine Analyzers



Obtain reliable and cost-effective results with *Mission®* Urinalysis Reagent Strips and Urine Analyzers!

- *Accurate*
- *Reliable*
- *Convenient*



Global Diagnostics for Local Markets™

Urinalysis Reagent Strips

Simple and Accurate

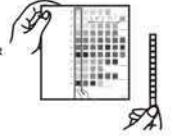
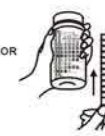
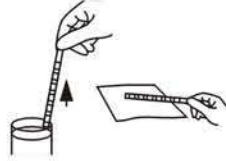
- Analytical sensitivity better than or comparable to market leaders
- High quality color chart ensures accurate visual reading

Flexible

- Compatible for visual and analyzer reading
- More than 30 different combinations available

Multiple Packaging Options and Long Shelf Life

- Canister Packaging
 - Available in 25, 50, 100 and 150 strips per kit
 - 2 year shelf life for unopened canisters which offers cost savings and convenience for high volume testing
 - 3 month shelf life for strips in opened canisters
- Pouch Packaging *New!*
 - Single-strip Pouch
 - Individually packaged strips with 1, 3, 6 and 20 strips and 1 color chart per kit for OTC or low volume testing
 - Unique packaging maintains 2 year shelf life for all strips in the kit compared to 3 months for remaining strips in an opened canister
 - Multi-strip Pouch
 - Canister Refill Kits with 25 strips/pouch uniquely packaged to save cost for low volume testing and extended shelf life by using the canister for refills



Step 1: Immerse strip into urine

Step 2: Remove excess urine

Step 3: Obtain results by analyzer or visual reading

Catalog No.	No. of Parameters	Type of Strip [♦]		Strips per Canister [◇]	Pouch Packaging [▲]	Reading Method			Analyzer-Read Strips: Standard (S) or Additional (A)	Parameters																	
		For Visual Reading	For Analyzer Reading (U120/U500)			Visual	U120	U500		ASC	GLU	BIL	KET	SG	BLO	pH	PRO	URO	NIT	LEU	ALB	CRE					
U031-131	13	13C	NA	100 [♦]	✓	✓	NA	NA	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
U031-111	11		11A	100	✓	✓	✓	✓	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
U031-101	10		10U	100	✓	✓	✓	✓	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
			10A			✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
			10C			✓	✓	✓	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
U031-091	9		9U	100	✓	✓	✓	✓	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
U031-081	8		8U	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
			8N			✓	✓	✓	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
			8S			✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
U031-071	7		7N	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
U031-061	6	6N	6NE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		6U	6UE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
U031-051	5	5B	5BE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		5N	5NE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		5S	5SE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		5U	5UE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
U031-041	4	4S	4SE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		4B	4BE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
		4K	4KE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4G	4GE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		4N	4NE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		4P	4PE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
U031-031	3	3P	3PE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		3K	3KE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
		3G	3GE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		3N	3NE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
U031-021	2	2G	2GE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		2K	2KE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		2N	2NE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		2B	2BE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		2U	2UE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		2S	2SE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
		2C	2CE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
U031-011	1	1B	1BE	100	✓	✓	✓	✓	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
		1P	1PE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
		1G	1GE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		1K	1KE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
		1R	1RE			✓	✓	✓		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

♦ Type of Strip:
 Visual Strip Size
 1-6 Parameters: 5 mm x 80 mm; 7-11 Parameters: 5 mm x 108 mm;
 12-13 Parameters: 5 mm x 121 mm
 U120/U500 Strip Size
 1-11 Parameters: 5 mm x 108 mm;
 "E" means extended strip length for 1-6 Parameters

◇ Also available in canisters of 25, 50 and 150 strips.
 ▲ Not available in canisters of 150 strips
 ▲ Single-strip Pouch available in 1, 3, 6 and 20 strip kit
 Canister Refill Kit, with 25 strips per pouch or canister, available in 3-pouch and 1- canister kit, or 4-pouch kit

U120 Urine Analyzer



Accurate

- Up to 120 tests/hour in Continuous Test Option
- Capable of reading 1 strip at a time in Single Test Option
- Test modes include Routine, STAT and QC
- Automatic calibration for accurate results and easy operation

Reliable

- Can read up to 4 Strip combinations with 8, 9, 10, 11 parameters, additional strips with 1-11 parameters available upon request
- Minimal training required

Convenient Operation

- Saves and recalls the last 2,000 results automatically
- Audible beep signals operator to dip strips in urine
- Can print up to 3 copies per test for convenient reviewing and easy record keeping
- Option to print results on sticker paper for quick and simple record management

Easy Data Management

- Includes RS232C port for easy data transfer to an external computer or LIS
- Optional Barcode Reader to record patient ID

Unique Lockout Functions *new!*

- Strip Lockout
 - Prevents using strips of another brand on the U120 Urine Analyzer
 - Requires barcode reader scan or manual entry of the canister code
- User Lockout
 - Eliminates unapproved users from testing
 - Up to 10 lab operators can perform testing, but only the lab administrator can change analyzer settings
- QC Lockout
 - Prevents testing without passing QC
 - QC tests can be performed once every 8 hours, day, week or month
 - Analyzer will alert when to run QC test
 - If QC tests fail, analyzer will switch to STAT mode and list "E" at the end of each test number

Specifications

Feature	Specifications
Analyzer Type	Manual
Methodology	Reflectance Photometry
Detection	Photosensitive Diode
Throughput	Single Test Option: 60 tests/hour Continuous Test Option: 120 tests/hour
Test Modes	Routine, STAT and QC
Lockout Functions	Strip Lockout: Available Upon Request; User/QC Lockout: Included with option to turn ON/OFF
Memory	Last 2,000 results
Strip Incubation Time	1 Minute
Wavelength of Monochromatic LED	525 nm and 635 nm
Standard Strips	8, 9, 10, 11 Parameters (5 mm x 108 mm)
Additional Strips Available	1-11 Parameters (5 mm x 108 mm); see URS Parameters
Total Combinations Per Analyzer	4 Combinations
Analyzer Ports	Standard RS232C Port for Barcode Reader or Data Transfer USB Port for Data Transfer 25 Pin Parallel Port for External Printer
Capabilities	Internal Thermal Printer (included) RS232C Barcode Reader (optional) Optional External Printer (not included) USB or RS232C Data Transfer Cable (optional)
Major Readable Barcodes	Code 128, Code 39, Codabar (NW-7), Interleaved 25, UPC-A, UPC-E, EAN 8, EAN 13
Calibration	Automatic
Available Languages on the Screen	English and additional language(s)
Operating Conditions	0-40°C (32-104°F); ≤ 85% RH
Storage Conditions	-5-50°C (23-122°F); ≤ 90% RH
Power Source	100-240 VAC, 50-60 Hz
Dimensions (L x W x H)	27.2 cm x 26.9 cm x 14.6 cm (10.7" x 10.6" x 5.7")
Display Dimensions (L x W)	10.8 cm x 5.7 cm (4.2" x 2.2")
Weight	2.6 kg (5.7 lbs)

Ordering Information

Product Name	Catalog No.	Components	Kit Box Dimensions (L x W x H) & Weight	Carton Dimensions (L x W x H) & Weight	Number of Kits/Carton
U120 Urine Analyzer	U111-101†	1 Urine Analyzer 1 Strip holder 2 Printer Paper Rolls	2 Fuses (2.0A) 1 Power Cord 1 Quick Start Guide 1 Instruction Manual	42.0 cm x 41.5 cm x 31 cm; 5.0 kg 16.4" x 16.2" x 12.1"; 176.4 oz	1
U120 Urine Analyzer with Barcode Reader	U111-111†	1 Urine Analyzer 1 Strip holder 2 Printer Paper Rolls 1 Barcode Reader (RS232C)	2 Fuses (2.0A) 1 Power Cord 1 Serial Splitter Cable (RS232C) 1 Quick Start Guide 1 Instruction Manual	44.5 cm x 44.5 cm x 40.0 cm; 5.5 kg 17.5" x 17.5" x 15.7"; 194 oz	1
Barcode Reader	U221-111†	1 Barcode Reader (RS232C)	1 Serial Splitter Cable (RS232C)	23.6 cm x 10.8 cm x 7.8 cm; 0.482 kg 9.3" x 4.3" x 3.1"; 17.0 oz 63.0 cm x 37.0 cm x 30.0 cm; 12.0 kg 24.8" x 14.6" x 11.8"; 423.3 oz	22
Printer Paper Rolls	U121-101	4 Printer Paper Rolls	Thermal Paper (0.06 m x 20 m): 200 results/roll Sticker Paper (0.06 m x 9 m): 100 results/roll	12.0 cm x 12.0 cm x 6.5 cm; 0.36 kg 4.7" x 4.7" x 2.6"; 12.7 oz 63.0 cm x 37.0 cm x 30.0 cm; 21.4 kg 24.8" x 14.6" x 11.8"; 684.3 oz 12.0 cm x 12.0 cm x 6.5 cm; 0.4 kg 4.7" x 4.7" x 2.6"; 14.1 oz 24.8" x 14.6" x 11.8"; 684.3 oz; 754.9 oz	50
U120 Data Transfer Kit	U221-131†	1 Data Transfer Cable (RS232C)	1 Package Insert	16.0 cm x 13.0 cm x 3.5 cm; 0.147 kg 6.3" x 5.1" x 1.4"; 5.2 oz 25.0 cm x 21.0 cm x 15.0 cm; 1.36 kg 9.8" x 8.3" x 5.9"; 48.0 oz	8

✓ CE Marked for sale in the European Community **CE**
† Cleared for US 510(k)

U500 Urine Analyzer



Accurate and Efficient

- Up to 500 tests/hour for medium/large volume sample testing
- Professional accuracy equivalent to market leader
- Automatic strip detection and alignment for better efficiency
- Test modes include Routine, STAT and QC

Easy to Operate

- Large touch screen LCD offers simple menu navigation
- Uniquely designed strip platform/waste tray unit for easy one-step cleaning

Convenient

- Automatic calibration and waste disposal reduce hands-on time
- Can read strips with 8, 9, 10, 11 parameters, additional strips with 1-11 parameters available upon request
- Strip selection of up to 4 combinations for analyzer reading
- Stores up to 2,000 records and automatically flags abnormal results
- Capable of printing results on sticker paper for quick and easy record management

Data Management Capability

- Includes RS232C port for easy data transfer to an external computer or LIS
- Optional Barcode Reader to record patient ID

Unique Lockout Functions Coming Soon!

- Strip Lockout
 - Prevents using strips of another brand on the U500 Urine Analyzer
 - Requires barcode reader scan or manual entry of the canister code
- User Lockout
 - Eliminates unapproved users from testing
 - Up to 10 lab operators can perform testing, but only the lab administrator can change analyzer settings
- QC Lockout
 - Prevents testing without passing QC
 - QC tests can be performed once every 8 hours, day, week or month
 - Analyzer will alert when to run QC test
 - If QC tests fail, analyzer will switch to STAT mode and list "E" at the end of each test number

Specifications

Feature	Specifications
Analyzer Type	Semi-Automatic
Methodology	Reflectance Photometry
Detection	Photosensitive Diode
Throughput	500 tests/hour (Measuring cycle: 7 seconds/test)
Test Modes	Routine, STAT and QC
Lockout Functions	Strip Lockout: Available Upon Request; User/QC Lockout: Included with option to turn ON/OFF
Memory	Last 2,000 Records
Strip Incubation Time	1 Minute
Wavelength	525 and 635 nm
Standard Strips	8, 9, 10, 11 Parameters (5 mm x 108 mm)
Additional Strips Available	1-11 Parameters (5 mm x 108 mm); see URS Parameters
Total Combinations Per Analyzer	4 Combinations
Waste Disposal Capacity	Up to 150 Strips
Analyzer Ports	Standard RS232C Port for Barcode Reader or Data Transfer 25 Pin Parallel Port for External Printer
Capabilities	Internal Thermal Printer (included) RS232C Barcode Reader (optional) Optional External Printer (not included) RS232C Data Transfer Cable (optional)
Major Readable Barcodes	Code 128, Code 39, Codabar (NW-7), Interleaved 25, UPC-A, UPC-E, EAN 8, EAN 13
Calibration	Automatic
Available Languages on the Screen	English and additional language(s)
Operating Conditions	0-40°C (32-104°F); ≤85% RH
Storage Conditions	-5-50°C (23-122°F); ≤90% RH
Power Source	100-240 VAC, 50-60 Hz
Dimensions (L x W x H)	36.6 cm x 28.3 cm x 19.5cm (14.4" x 11.1" x 7.7")
Display Dimensions (L x W)	11.5 cm x 9.0 cm (4.5" x 3.5")
Weight	4.0 kg (8.8 lbs)

Ordering Information

Product Name	Catalog No.	Components	Kit Box Dimensions (L x W x H) & Weight	Carton Dimensions (L x W x H) & Weight	Number of Kits/Carton
U500 Urine Analyzer	U211-101 [✓]	1 Urine Analyzer 1 Strip Platform/Waste Tray 2 Printer Paper Rolls	2 Fuses (2.0A) 1 Power Cord 1 Instruction Manual	51.0 cm x 42.0 cm x 38.5 cm; 7 kg 20.1" x 16.5" x 15.2"; 246.9 oz	1
U500 Urine Analyzer with Barcode Reader	U211-111 [✓]	1 Urine Analyzer 1 Strip Platform/Waste Tray 2 Printer Paper Rolls 1 Barcode Reader (RS232C)	2 Fuses (2.0A) 1 Power Cord 1 Serial Splitter Cable (RS232C) 1 Instruction Manual	55.0 cm x 55.0 cm x 55.0cm; 9.2 kg 21.7" x 21.7" x 21.7"; 324.5 oz	1
Barcode Reader	U221-111 ^{✓†}	1 Barcode Reader (RS232C)	1 Serial Splitter Cable (RS232C)	23.6 cm x 10.8 cm x 7.8 cm; 0.482 kg 9.3" x 4.3" x 3.1"; 17.0 oz	22
Printer Paper Rolls	U121-101	4 Printer Paper Rolls	Thermal Paper (0.06 m x 20 m): 200 results/roll Sticker Paper (0.06 m x 9 m): 100 results/roll	12.0 cm x 12.0 cm x 6.5 cm; 0.360 kg 4.7" x 4.7" x 2.6"; 12.7oz 12.0 cm x 12.0 cm x 6.5 cm; 0.40 kg 4.7" x 4.7" x 2.6"; 14.1oz	50
U500 Data Transfer Kit	U221-131 [✓]	1 Data Transfer Cable (RS232C)	1 Package Insert	16.0 cm x 13.0 cm x 3.5 cm; 0.147kg 6.3" x 5.1" x 1.4"; 5.2 oz	8

We also offer other rapid diagnostic and medical products:

Blood Glucose Monitoring Systems, Immunoassay EIA/ELISA and more.

✓ CE Marked for sale in the European Community **CE**
† Cleared for US 510(k)



Mission® Urinalysis Reagent Strips (Urine)

Package Insert

REF U031-011	REF U031-051	REF U031-091	English
REF U031-021	REF U031-061	REF U031-101	
REF U031-031	REF U031-071	REF U031-111	
REF U031-041	REF U031-081		

For rapid detection of multiple analytes in human urine.
For *in vitro* diagnostic use only.

INTENDED USE

The Urinalysis Reagent Strips (Urine) are firm plastic strips onto which several separate reagent areas are affixed. The test is for the qualitative and semi-quantitative detection of one or more of the following analytes in urine: Ascorbic acid, Glucose, Bilirubin, Ketone (Acetoacetic acid), Specific Gravity, Blood, pH, Protein, Urobilinogen, Nitrite and Leukocytes.

SUMMARY

Urine undergoes many changes during states of disease or body dysfunction before blood composition is altered to a significant extent. Urinalysis is a useful procedure as an indicator of health or disease, and as such, is a part of routine health screening. The Urinalysis Reagent Strips (Urine) can be used in general evaluation of health, and aids in the diagnosis and monitoring of metabolic or systemic diseases that affect kidney function, endocrine disorders and diseases or disorders of the urinary tract.^{1,2}

PRINCIPLE AND EXPECTED VALUES

Ascorbic acid: This test involves decolorization of Tillmann's reagent. The presence of ascorbic acid causes the color of the test field to change from blue-green to orange. Patients with adequate diet may excrete 2-10 mg/dL daily. After ingesting large amounts of ascorbic acid, levels can be around 200 mg/dL.

Glucose: This test is based on the enzymatic reaction that occurs between glucose oxidase, peroxidase and chromogen. Glucose is first oxidized to produce gluconic acid and hydrogen peroxide in the presence of glucose oxidase. The hydrogen peroxide reacts with potassium iodide chromogen in the presence of peroxidase. The extent to which the chromogen is oxidized determines the color which is produced, ranging from green to brown. Glucose should not be detected in normal urine. Small amounts of glucose may be excreted by the kidney.³ Glucose concentrations as low as 100 mg/dL may be considered abnormal if results are consistent.

Bilirubin: This test is based on azo-coupling reaction of bilirubin with diazotized dichloroaniline in a strongly acidic medium. Varying bilirubin levels will produce a pinkish-tan color proportional to its concentration in urine. In normal urine, no bilirubin is detectable by even the most sensitive methods. Even trace amounts of bilirubin require further investigation. Atypical results (colors different from the negative or positive color blocks shown on the color chart) may indicate that bilirubin-derived bile pigments are present in the urine specimen, and are possibly masking the bilirubin reaction.

Ketone: This test is based on ketones reacting with nitroprusside and acetoacetic acid to produce a color change ranging from light pink for negative results to a darker pink or purple color for positive results. Ketones are normally not present in urine. Detectable ketone levels may occur in urine during physiological stress conditions such as fasting, pregnancy and frequent strenuous exercise.⁴⁻⁶ In starvation diets, or in other abnormal carbohydrate metabolism situations, ketones appear in the urine in excessively high concentration before serum ketones are elevated.⁷

Specific Gravity: This test is based on the apparent pKa change of certain pretreated polyelectrolytes in relation to ionic concentration. In the presence of an indicator, colors range from deep blue-green in urine of low ionic concentration to green and yellow-green in urine of increasing ionic concentration. Randomly collected urine may vary in specific gravity from 1.003-1.035.⁸ Twenty-four hour urine from healthy adults with normal diets and fluid intake will have a specific gravity of 1.016-1.022.³ In cases of severe renal damage, the specific gravity is fixed at 1.010, the value of the glomerular filtrate.

Blood: This test is based on the peroxidase-like activity of hemoglobin which catalyzes the reaction of diisopropylbenzene dihydroperoxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The resulting color ranges from orange to green to dark blue. Any green spots or green color development on the reagent area within 60 seconds is significant and the urine specimen should be examined further. Blood is often, but not invariably, found in the urine of menstruating females. The significance of a trace reading varies among patients and clinical judgment is required in these specimens.

pH: This test is based on a double indicator system which gives a broad range of colors covering the entire urinary pH range. Colors range from orange to yellow and green to blue. The expected range for normal urine specimens from newborns is pH 5-7.⁹ The expected range for other normal urine specimens is pH 4.5-8, with an average result of pH 6.⁹

Protein: This reaction is based on the phenomenon known as the "protein error" of pH indicators where an indicator that is highly buffered will change color in the presence of proteins (anions) as the indicator releases hydrogen ions to the protein. At a constant pH, the development of any green color is due to the presence of protein. Colors range from yellow to yellow-green for negative results and green to green-blue for positive results. 1-14 mg/dL of protein may be excreted by a normal kidney.¹⁰ A color matching any block greater than trace indicates significant proteinuria. Clinical judgment is required to evaluate the significance of trace results.

Urobilinogen: This test is based on a modified Ehrlich reaction between p-diethylaminobenzaldehyde and urobilinogen in strongly acidic medium to produce a pink color. Urobilinogen is one of the major compounds produced in heme synthesis and is a normal substance in urine. The expected range for normal urine with this test is 0.2-1.0 mg/dL (3.5-17 µmol/L).⁸ A result of 2.0 mg/dL (35 µmol/L) may be of clinical significance, and the patient specimen should be further evaluated.

Nitrite: This test depends upon the conversion of nitrate to nitrite by the action of Gram negative bacteria in the urine. In an acidic medium, nitrite in the urine reacts with p-arsanilic acid to form a diazonium compound. The diazonium compound in turn couples with 1 N-(1-naphthyl) ethylenediamine to produce a pink color. Nitrite is not detectable in normal urine.⁹ The nitrite area will be positive in some cases of infection, depending on how long the urine specimens were retained in the bladder prior to collection. Retrieval of positive cases with the nitrite test ranges from as low as 40% in cases where little bladder incubation occurred, to as high as approximately 80% in cases where bladder incubation took place for at least 4 hours.

Leukocytes: This test reveals the presence of granulocyte esterases. The esterases cleave a derivatized pyrazole amino acid ester to liberate derivatized hydroxy pyrazole. This pyrazole then reacts with a diazonium salt to produce a beige-pink to purple color. Normal urine specimens generally yield negative results. Trace results may be of questionable clinical significance. When trace results occur, it is recommended to retest using a fresh specimen from the same patient. Repeated trace and positive results are of clinical significance.

REAGENTS AND PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Based on the dry weight at the time of impregnation, the concentrations given may vary within manufacturing tolerances. The following table below indicates read times and performance characteristics for each parameter.

Reagent	Read Time	Composition	Description
Ascorbic Acid (ASC)	30 seconds	2,6-dichlorophenolindophenol; buffer and non-reactive ingredients	Detects ascorbic acid as low as 5-10 mg/dL (0.28-0.56 mmol/L).
Glucose (GLU)	30 seconds	glucose oxidase; peroxidase; potassium iodide; buffer; non-reactive ingredients	Detects glucose as low as 50-100 mg/dL (2.5-5 mmol/L).
Bilirubin (BIL)	30 seconds	2,4-dichloroaniline diazonium salt; buffer and non-reactive ingredients	Detects bilirubin as low as 0.4-1.0 mg/dL (6.8-17 µmol/L).
Ketone (KET)	40 seconds	sodium nitroprusside; buffer	Detects acetoacetic acid as low as 2.5-5 mg/dL (0.25-0.5 mmol/L).
Specific Gravity (SG)	45 seconds	bromthymol blue indicator; buffer and non-reactive ingredients; poly (methyl vinyl ether/maleic anhydride); sodium hydroxide	Determines urine specific gravity between 1.000 and 1.030. Results correlate with values obtained by refractive index method within ± 0.005.
Blood (BLO)	60 seconds	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); diisopropylbenzene dihydroperoxide; buffer and non-reactive ingredients	Detects free hemoglobin as low as 0.018-0.060 mg/dL or 5-10 Ery/µL in urine specimens with ascorbic acid content of <50 mg/dL.
pH	60 seconds	methyl red sodium salt; bromthymol blue; non-reactive ingredients	Permits the quantitative differentiation of pH values within the range of 5-9.
Protein (PRO)	60 seconds	tetrabromophenol blue; buffer and non-reactive ingredients	Detects albumin as low as 7.5-15 mg/dL (0.075-0.15 g/L).
Urobilinogen (URO)	60 seconds	p-diethylaminobenzaldehyde; buffer and non-reactive ingredients	Detects urobilinogen as low as 0.2-1.0 mg/dL (3.5-17 µmol/L).
Nitrite (NIT)	60 seconds	p-arsanilic acid; N-(1-naphthyl) ethylenediamine; non-reactive ingredients	Detects sodium nitrite as low as 0.05-0.1 mg/dL in urine with a low specific gravity and less than 30 mg/dL ascorbic acid.
Leukocytes (LEU)	120 seconds	derivatized pyrrole amino acid ester; diazonium salt; buffer; non-reactive ingredients	Detects leukocytes as low as 9-15 white blood cells Leu/µL in clinical urine.

The performance characteristics of the Urinalysis Reagent Strips (Urine) have been determined in both laboratory and clinical tests. Parameters of importance to the user are sensitivity, specificity, accuracy and precision. Generally, this test has been developed to be specific for the parameters to be measured with the exceptions of the interferences listed. Please refer to the Limitations section in this package insert.

Interpretation of visual results is dependent on several factors: the variability of color perception, the presence or absence of inhibitory factors, and the lighting conditions when the strip is read. Each color block on the chart corresponds to a range of analyte concentrations.

PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only. Do not use after the expiration date.
- The strip should remain in the closed canister until use.
- Do not touch the reagent areas of the strip.
- Discard any discolored strips that may have deteriorated.
- All specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent.
- The used strip should be discarded according to local regulations after testing.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the closed canister either at room temperature or refrigerated (2-30°C). Keep out of direct sunlight. The strip is stable through the expiration date printed on the canister label. Do not remove the desiccant. Remove only enough strips for immediate use. Replace cap immediately and tightly. **DO NOT FREEZE.** Do not use beyond the expiration date.

Note: Once the canister has been opened, the remaining strips are stable for up to 3 months. Stability may be reduced in high humidity conditions.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

A urine specimen must be collected in a clean and dry container and tested as soon as possible. Do not centrifuge. The use of urine preservatives is not recommended. If testing cannot be done within an hour after voiding, refrigerate the specimen immediately and let it return to room temperature before testing.

Prolonged storage of unpreserved urine at room temperature may result in microbial proliferation with resultant changes in pH. A shift to alkaline pH may cause false positive results with the protein test area. Urine containing glucose may decrease in pH as organisms metabolize the glucose.

Contamination of the urine specimen with skin cleansers containing chlorhexidine may affect protein (and to a lesser extent, specific gravity and bilirubin) test results.

MATERIALS

Materials Provided

- Strips
- Package insert

Materials Required But Not Provided

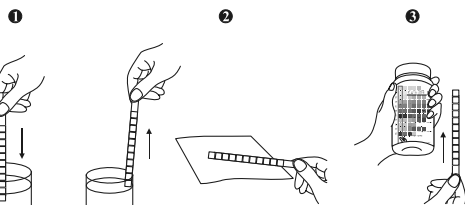
- Specimen collection container
- Timer

DIRECTIONS FOR USE

Allow the strip, urine specimen, and/or controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing.

- Remove the strip from the closed canister and use it as soon as possible. Immediately close the canister tightly after removing the required number of strip(s). Completely immerse the reagent areas of the strip in fresh, well-mixed urine and immediately remove the strip to avoid dissolving the reagents. See illustration 1 below.
- While removing the strip from the urine, run the edge of the strip against the rim of the urine container to remove excess urine. Hold the strip in a horizontal position and bring the edge of the strip into contact with an absorbent material (e.g. a paper towel) to avoid mixing chemicals from adjacent reagent areas and/or soiling hands with urine. See illustration 2 below.
- Compare the reagent areas to the corresponding color blocks on the canister label at the specified times. Hold the strip close to the color blocks and match carefully. See illustration 3 below.

Note: Results may be read up to 2 minutes after the specified times.



INTERPRETATION OF RESULTS

Results are obtained by direct comparison of the color blocks printed on the canister label. The color blocks represent nominal values; actual values will vary close to the nominal values. In the event of unexpected or questionable results, the following steps are recommended: confirm that the strips have been tested within the expiration date printed on the canister label, compare results with known positive and negative controls and repeat the test using a new strip. If the problem persists, discontinue using the strip immediately and contact your local distributor.

QUALITY CONTROL

For best results, performance of reagent strips should be confirmed by testing known positive and negative specimens/controls whenever a new test is performed, or whenever a new canister is first opened. Each laboratory should establish its own goals for adequate standards of performance.

LIMITATIONS

Note: The Urinalysis Reagent Strips (Urine) may be affected by substances that cause abnormal urine color such as drugs containing azo dyes (e.g. Pyridium®. Azo Gantrisin®, Azo Gantanol®), nitrofurantoin (Microdantin®, Furadantin®), and riboflavin.⁸ The color development on the test pad may be masked or a color reaction may be produced that could be interpreted as false results.

Ascorbic acid: No interference is known.
Glucose: The reagent area does not react with lactose, galactose, fructose or other metabolic substances, nor with reducing metabolites of drugs (e.g. salicylates and nalidixic acid). Sensitivity may be decreased in specimens with high specific gravity (>1.025) and with ascorbic acid concentrations of ≥ 25 mg/dL. High ketone levels ≥ 100 mg/dL may cause false negative results for specimens containing a small amount of glucose (50-100 mg/dL).

Bilirubin: Bilirubin is absent in normal urine, so any positive result, including a trace positive, indicates an underlying pathological condition and requires further investigation. Reactions may occur with urine containing large doses of chlorpromazine or rifampin that might be mistaken for positive bilirubin.⁹ The presence of bilirubin-derived bile pigments may mask the bilirubin reaction. This phenomenon is characterized by color development on the test patch that does not correlate with the colors on the color chart. Large concentrations of ascorbic acid may decrease sensitivity.

Ketone: The test does not react with acetone or β-hydroxybutyrate.⁸ Urine specimens of high pigment, and other substances containing sulphydryl groups may occasionally give reactions up to and including trace (±).⁹

Specific Gravity: Ketoacidosis or protein higher than 300 mg/dL may cause elevated results. Results are not affected by non-ionic urine components such as glucose. If the urine has a pH of 7 or greater, add 0.005 to the specific gravity reading indicated on the color chart.

Blood: A uniform blue color indicates the presence of myoglobin, hemoglobin or hemolyzed erythrocytes.⁸ Scattered or compacted blue spots indicate intact erythrocytes. To enhance accuracy, separate color scales are provided for hemoglobin and for erythrocytes. Positive results with this test are often seen with urine from menstruating females. It has been reported that urine of high pH reduces sensitivity, while moderate to

high concentration of ascorbic acid may inhibit color formation. Microbial peroxidase, associated with urinary tract infection, may cause a false positive reaction. The test is slightly more sensitive to free hemoglobin and myoglobin than to intact erythrocytes.

pH: If the procedure is not followed and excess urine remains on the strip, a phenomenon known as "runover" may occur, in which the acid buffer from the protein reagent will run onto the pH area, causing the pH result to appear artificially low. pH readings are not affected by variations in urinary buffer concentration.

Protein: Any green color indicates the presence of protein in the urine. This test is highly sensitive for albumin, and less sensitive to hemoglobin, globulin and mucoprotein.⁸ A negative result does not rule out the presence of these other proteins. False positive results may be obtained with highly buffered or alkaline urine. Contamination of urine specimens with quaternary ammonium compounds or skin cleansers containing chlorhexidine may produce false positive results.⁸ The urine specimens with high specific gravity may give false negative results.

Urobilinogen: All results lower than 1 mg/dL urobilinogen should be interpreted as normal. A negative result does not at any time preclude the absence of urobilinogen. The reagent area may react with interfering substances known to react with Ehrlich's reagent, such as p-aminosalicylic acid and sulfonamides.⁹ False negative results may be obtained if formalin is present. The test cannot be used to detect porphobilinogen.

Nitrite: The test is specific for nitrite and will not react with any other substance normally excreted in urine. Any degree of uniform pink to red color should be interpreted as a positive result, suggesting the presence of nitrite. Color intensity is not proportional to the number of bacteria present in the urine specimen. Pink spots or pink edges should not be interpreted as a positive result. Comparing the reacted reagent area on a white background may aid in the detection of low nitrite levels, which might otherwise be missed. Ascorbic acid above 30 mg/dL may cause false negatives in urine containing less than 0.05 mg/dL nitrite ions. The sensitivity of this test is reduced for urine specimens with highly buffered alkaline urine or with high specific gravity. A negative result does not at any time preclude the possibility of bacteruria. Negative results may occur in urinary tract infections from organisms that do not contain reductase to convert nitrate to nitrite; when urine has not been retained in the bladder for a sufficient length of time (at least 4 hours) for reduction of nitrate to nitrite to occur; when receiving antibiotic therapy or when dietary nitrate is absent.

Leukocytes: The result should be read between 60-120 seconds to allow for complete color development. The intensity of the color that develops is proportional to the number of leukocytes present in the urine specimen. High specific gravity or elevated glucose concentrations (≥ 2,000 mg/dL) may cause test results to be artificially low. The presence of cephalixin, cephalothin, or high concentrations of oxalic acid may also cause test results to be artificially low. Tetracycline may cause decreased reactivity, and high levels of the drug may cause a false negative reaction. High urinary protein may diminish the intensity of the reaction color. This test will not react with erythrocytes or bacteria common in urine.⁸

BIBLIOGRAPHY

- Free AH, Free HM. *Urinalysis, Critical Discipline of Clinical Science*. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 3(4): 481-531, 1972.
- Yoder J, Adams EC, Free, AH. *Simultaneous Screening for Urinary Occult Blood, Protein, Glucose, and pH*. Amer. J. Med Tech. 31:285, 1965.
- Shchersten B, Fritz H. *Subnormal Levels of Glucose in Urine*. JAMA 201:129-132, 1967.
- McGarry JD, Lilly. Lecture, 1978: New Perspectives in the Regulation of Ketogenesis. Diabetes 28: 517-523 May, 1978.
- Williamson DH. *Physiological Ketoses, or Why Ketone Bodies?* Postgrad. Med. J. (June Suppl.): 372-375, 1971.
- Paterson P, et al. *Maternal and Fetal Ketone Concentrations in Plasma and Urine*. Lancet: 862-865; April 22, 1967.
- Fraser J, et al. *Studies with a Simplified Nitroprusside Test for Ketone Bodies in Urine, Serum, Plasma and Milk*. Clin. Chem. Acta II: 372-378, 1965.
- Henry JB, et al. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 20th Ed. Philadelphia. Saunders. 371-372, 375, 379, 382, 385, 2001.
- Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. W.B. Saunders Company. 1976.
- Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 2nd Ed. 2205, 1994.

Index of Symbols					
	Consult instructions for use		Tests per kit		Manufacturer
	For <i>in vitro</i> diagnostic use only		Use by		Do not reuse
	Store between 2-30°C		Lot Number		REF
	Authorized Representative				

ACON Laboratories, Inc.
10125 Mesa Rim Road,
San Diego, CA 92121, USA

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany



To: **Agencia Medicamentului și Dispozitivelor Medicale**
Chisinau str. Korolenko 2/1
MD-2028 Moldova

MANUFACTURER AUTHORISATION FORM

Italy, 27 November 2023

We, Adaltis S.r.l., certified ISO 9001 and ISO 13485, as the manufacturer of In Vitro Diagnostic Medical Devices (Instruments and Reagents), with legal site in Via Durini 27, 20122 Milano - Italy and production site in Via Luigi Einaudi 7, 00012 Guidonia Montecelio (RM) – Italy,

we hereby authorise company **SRL SANMEDICO** having a registered office at A. Corobceanu street 7A, apt. 9, Chișinău MD-2012, Moldova,

to register with entitled institutions in Moldova, to commercialise as our distributor, to proceed and sign and submit offers and sign contracts on their behalf, deliver the goods for the following of our products for the tender/ project '*CENTER FOR CENTRALIZED PUBLIC PROCUREMENT IN HEALTH, no. ocds-b3wdp1-MD-1699619738481, The centralized purchase of Reagents for the Immunological Laboratory according to the needs of public medical and sanitary institutions (IMSP) for the year 2024*', in Moldova:

- **EIAgen HCV Ab (v.4) item 071067 (96T/kit)**
- **EIAgen HCV Ab (v.4) item 071064 (192T/kit)**
- **EIAgen HBsAg item 071011 (96T/kit)**
- **EIAgen HBsAg item 071012 (192T/kit)**

This authorisation is issued 27 November 2023 and shall expire 12 (twelve) months later, for all purposes. This authorisation may be renewable on request only.

ADALTIS S.r.l.

Adaltis S.r.l.
Via Luigi Einaudi, 7
00012 Guidonia Montecelio - Roma
Cod. Fisc. 06797400964

Marc Eijkhout
Sales Director

Adaltis S.r.l.

Headquarter

Via Luigi Einaudi, 7
00012 Guidonia Montecelio (RM) - Italy
Tel. +39 0774 579.1
Fax +39 0774 353085
service@adaltis.net - info@adaltis.net

Legal site

Via Durini, 27
20122 Milano - Italy
Cap. Soc. € 11.000,00 - REA: MI1915413
C.F. 06797400964 - P.I. IT06797400964
order@adaltis.net - www.adaltis.net

Certificate of Registration

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM - ISO 9001:2015

This is to certify that:

Adaltis S.r.l
Via Durini 27
Milan
20122
Italy

Holds Certificate Number:

FM 718043

and operates a Quality Management System which complies with the requirements of ISO 9001:2015 for the following scope:

Design, manufacture, distribution and service for in vitro diagnostic instruments for applications in the field of infectious diseases and clinical chemistry. Design, manufacture and distribution for in vitro diagnostic reagents for applications in the field of infectious diseases and clinical chemistry.

For and on behalf of BSI:

Matt Page, Managing Director Assurance - UK & Ireland

Original Registration Date: 2019-03-19

Latest Revision Date: 2022-03-02

Effective Date: 2022-03-26

Expiry Date: 2025-03-25

Page: 1 of 2



...making excellence a habit.™

Certificate No: FM 718043

Location

Adaltis S.r.l.
Via Durini, 27
Milan
20122
Italy

Adaltis S.r.l.
Via Luigi Einaudi, 7
Guidonia Montecelio (Roma)
00012
Italy

Registered Activities

Legal Manufacturer.

Design, Marketing / Sales, Reagents Production & Quality Control, Planning / Purchasing, Warehouse, Shipment, Quality Assurance, Human Resource, Order Entry and Order Processing, Customer Care Center, Regulatory Affairs.



Original Registration Date: 2019-03-19

Latest Revision Date: 2022-03-02

Effective Date: 2022-03-26

Expiry Date: 2025-03-25

Page: 2 of 2

This certificate was issued electronically and remains the property of BSI and is bound by the conditions of contract.
An electronic certificate can be authenticated [online](#).
Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory

Information and Contact: BSI, Kitemark Court, Davy Avenue, Knowlhill, Milton Keynes MK5 8PP. Tel: + 44 345 080 9000
BSI Assurance UK Limited, registered in England under number 7805321 at 389 Chiswick High Road, London W4 4AL, UK.
A Member of the BSI Group of Companies.

Certificate of Registration

QUALITY MANAGEMENT SYSTEM - ISO 13485:2016 & EN ISO 13485:2016

This is to certify that:

Adaltis S.r.l.
Via Durini, 27
Milan
20122
Italy

Holds Certificate Number:

MD 718042

and operates a Quality Management System which complies with the requirements of ISO 13485:2016 & EN ISO 13485:2016 for the following scope:

Design, manufacture, distribution and service for in vitro diagnostic instruments for applications in the field of infectious diseases and clinical chemistry. Design, manufacture and distribution for in vitro diagnostic reagents for applications in the field of infectious diseases and clinical chemistry

For and on behalf of BSI:

Graeme Tunbridge, Senior Vice President Medical Devices

Original Registration Date: 2019-12-10

Latest Revision Date: 2022-03-24

Effective Date: 2022-03-26

Expiry Date: 2025-03-25

Page: 1 of 2



...making excellence a habit.™

Certificate No: **MD 718042**

Location	Registered Activities
Adaltis S.r.l. Via Durini, 27 Milan 20122 Italy	Legal Manufacturer
Adaltis S.r.l. Via Luigi Einaudi, 7 Guidonia Montecelio (Roma) 00012 Italy	Design, Marketing/Sales, Reagents Production & Quality Control, Instruments Division - Software Development/Quality Control, Planning/Purchasing, Warehouse/Shipment, Quality Assurance, Human Resource, Order Entry and Order Processing, Customer Care Centre, Regulatory Affairs.



Original Registration Date: 2019-12-10

Latest Revision Date: 2022-03-24

Effective Date: 2022-03-26

Expiry Date: 2025-03-25

Page: 2 of 2

This certificate was issued electronically and remains the property of BSI and is bound by the conditions of contract.
An electronic certificate can be authenticated [online](#).
Printed copies can be validated at www.bsigroup.com/ClientDirectory

Information and Contact:

BSI Group The Netherlands B.V., John M. Keynesplein 9, 1066 EP Amsterdam, The Netherlands | Tel: +31 20 3460 780
BSI Group The Netherlands B.V. is registered in The Netherlands under number 33264284 | A Member of the BSI Group Holdings B.V.



DICHIARAZIONE DI CONFORMITÀ "CE" PER DISPOSITIVI MEDICI DIAGNOSTICI IN VITRO

EC Declaration of Conformity for IN VITRO DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICES

La sottoscritta, fabbricante,
We, the undersigned manufacturer

Adaltis S.r.l.

Con Sede Legale in
Whit Registered Office in

**Via Durini, 27
20122 Milano - Italy**

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto descritto di seguito:
Herewith declare under our sole responsibility that the product described here below:

EIAgen HCV Ab (v.4) Kit

Codici/Codes 071067 / 071064 / 071068 - Nr. 96 / 192 / 480 tests

**E' CLASSIFICATO COME DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO APPARTENENTE
ALL'"ALLEGATO II Lista A"; VALUTAZIONE DELLA CONFORMITA' SECONDO:
ALLEGATO V certificato N. 20102 Rev.7 e documento aggiuntivo N. 38929 Rev.0.
ALLEGATO VII certificato N. 20109 Rev.6 e documento aggiuntivo N. 38904 Rev.0.**

Ente Notificato: GMED 0459

*is classified as a IVD listed in Annex II List A; conformity assessment route:
ANNEX V certificate N. 20102 Rev.7 and addition document N. 38929 Rev.0.
ANNEX VII certificate N. 20109 Rev.6 and addition document N. 38904 Rev.0.
Notified Body: GMED 0459*

Ed è in conformità con i requisiti della
And it is in compliance with the requirements of the

**DIRETTIVA 98/79/CE IVDD del Parlamento europeo e del Consiglio, del 27 ottobre 1998, relativa ai
dispositivi medico-diagnostici in vitro, pubblicata nella Gazzetta Ufficiale il 7 dicembre 1998.**

*EC COUNCIL DIRECTIVE IVDD 98/79/CE of the European Parliament and of the Council of 27th October 1998 of In Vitro
Diagnostic Medical Device, published in the Official Journal on 7th December 1998.*

Inoltre, sono applicate le seguenti Norme Armonizzate:

In addition, the following Harmonized Standards are applied:

EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 13641, EN ISO 18113 - PART 1 & 2, EN ISO 15223-1, EN 13612, EN 62366, EN ISO 23640

Prima Emissione/First Emission: 22 Novembre 2010 / 22 November 2010

Emissione Corrente/Current Emission: 14 Maggio 2022 / 14 May 2022

A blue ink signature of Roberto Steinhaus, the Quality Assurance & Regulatory Affairs Manager.

RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITA' & AFFARI REGOLATORI / Quality Assurance & Regulatory Affairs Manager
(Roberto Steinhaus)

A blue ink signature of Marco Spadaccioli, the General Manager.

DIRETTORE GENERALE / General Manager
(Marco Spadaccioli)



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

 96

REF 071064

 192

REF 071068

 480



IVD

CE 0459

This package insert must be read carefully before product use.

Package insert instructions must be carefully followed.

Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions in this package.



Manufacturer:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

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

www.adaltis.net

en

SYMBOLS USED ON LABELS

English EN							
	In Vitro Diagnostic Medical Device	Catalogue Number	Lot Number	Attention, See Instructions For Use	Temperature Limitation	Use By	Number of Test
	Manufacturer	Keep away from Sunlight	Date of Manufacture	Microplate	Positive Control	Negative Control	Calibrator
	Conjugate	Sample Diluent	Substrate TMB	Stop Solution (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Wash Buffer Conc. (20x)	Assay Diluent	Reconstitute with x mL
	Biological Risk	Danger	Warning				

Attention:

Stop Solution classified as: Skin Corr. 1A



- **Signal word:**
Danger
- **Hazard-determining components of labelling:**
Sulphuric acid
- **Hazard statements:**
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- **Precautionary statements:**
P260 Do not breathe dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P303+P361+P353 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water/shower.
P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P310 Immediately call a POISON CENTER/doctor.
P405 Store locked up.
P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Attention:

Negative Control, Positive Control, Calibrator, Conjugate, Sample Diluent, Assay Diluent and Wash Buffer Concentrate 20X classified as: Skin Sens. 1



- **Signal word:**
Warning
- **Hazard-determining components of labelling:**
Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- **Hazard statements:**
H317 May cause an allergic skin reaction.
- **Precautionary statements:**
P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P321 Specific treatment (see on this label).
P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P302+P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

Refer to www.adaltis.net for the Safety Data Sheets.

A. INTENDED USE

Fourth generation Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the determination of antibodies to Hepatitis C Virus in human plasma (EDTA, Heparin and Citrate) and sera. The kit may be used for the screening of blood units of HCV-infected patients.

For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) define Hepatitis C infection as follows:

"Hepatitis C is a viral infection of the liver which had been referred to as parenterally transmitted "non A, non B hepatitis" until identification of the causative agent in 1989. The discovery and characterization of the hepatitis C virus (HCV) led to the understanding of its primary role in post transfusion hepatitis and its tendency to induce persistent infection.

HCV is a major cause of acute hepatitis and chronic liver disease, including cirrhosis and liver cancer. Globally, an estimated 170 million persons are chronically infected with HCV and 3 to 4 million persons are newly infected each year. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. The major causes of HCV infection worldwide are use of unscreened blood transfusions, and re-use of needles and syringes that have not been adequately sterilized. No vaccine is currently available to prevent hepatitis C and treatment for chronic hepatitis C is too costly for most persons in developing countries to afford. Thus, from a global perspective, the greatest impact on hepatitis C disease burden will likely be achieved by focusing efforts on reducing the risk of HCV transmission from nosocomial exposures (e.g. blood transfusions, unsafe injection practices) and high-risk behaviours (e.g. injection drug use).

Hepatitis C virus (HCV) is one of the viruses (A, B, C, D, and E), which together account for the vast majority of cases of viral hepatitis. It is an enveloped RNA virus in the flaviviridae family which appears to have a narrow host range. Humans and chimpanzees are the only known species susceptible to infection, with both species developing similar disease. An important feature of the virus is the relative mutability of its genome, which in turn is probably related to the high propensity (80%) of inducing chronic infection. HCV is clustered into several distinct genotypes which may be important in determining the severity of the disease and the response to treatment.

The incubation period of HCV infection before the onset of clinical symptoms ranges from 15 to 150 days. In acute infections, the most common symptoms are fatigue and jaundice; however, the majority of cases (between 60% and 70%), even those that develop chronic infection, are asymptomatic. About 80% of newly infected patients progress to develop chronic infection. Cirrhosis develops in about 10% to 20% of persons with chronic infection, and liver cancer develops in 1% to 5% of persons with chronic infection over a period of 20 to 30 years. Most patients suffering from liver cancer who do

not have hepatitis B virus infection have evidence of HCV infection. The mechanisms by which HCV infection leads to liver cancer are still unclear. Hepatitis C also exacerbates the severity of underlying liver disease when it coexists with other hepatic conditions. In particular, liver disease progresses more rapidly among persons with alcoholic liver disease and HCV infection. HCV is spread primarily by direct contact with human blood. Transmission through blood transfusions that are not screened for HCV infection, through the reuse of inadequately sterilized needles, syringes or other medical equipment, or through needle-sharing among drug-users, is well documented. Sexual and perinatal transmission may also occur, although less frequently. Other modes of transmission such as social, cultural, and behavioural practices using percutaneous procedures (e.g. ear and body piercing, circumcision, tattooing) can occur if inadequately sterilized equipment is used. HCV is not spread by sneezing, hugging, coughing, food or water, sharing eating utensils, or casual contact.

In both developed and developing countries, high risk groups include injecting drug users, recipients of unscreened blood, haemophiliacs, dialysis patients and persons with multiple sex partners who engage in unprotected sex. In developed countries, it is estimated that 90% of persons with chronic HCV infection are current and former injecting drug users and those with a history of transfusion of unscreened blood or blood products. In many developing countries, where unscreened blood and blood products are still being used, the major means of transmission are unsterilized injection equipment and unscreened blood transfusions. In addition, people who use traditional scarification and circumcision practices are at risk if they use or re-use unsterilized tools.

WHO estimates that about 170 million people, 3% of the world's population, are infected with HCV and are at risk of developing liver cirrhosis and/or liver cancer. The prevalence of HCV infection in some countries in Africa, the Eastern Mediterranean, South-East Asia and the Western Pacific (when prevalence data are available) is high compared to some countries in North America and Europe.

Diagnostic tests for HCV are used to prevent infection through screening of donor blood and plasma, to establish the clinical diagnosis and to make better decisions regarding medical management of a patient. Diagnostic tests commercially available today are based on Enzyme immunoassay (EIA) for the detection of HCV specific antibodies. EIAs can detect more than 95% of chronically infected patients but can detect only 50% to 70% of acute infections. A recombinant immunoblot assay (RIBA) that identifies antibodies which react with individual HCV antigens is often used as a supplemental test for confirmation of a positive EIA result. Testing for HCV circulating by amplification tests RNA (e.g. polymerase chain reaction or PCR, branched DNA assay) is also being utilized for confirmation of serological results as well as for assessing the effectiveness of antiviral therapy. A positive result indicates the presence of active infection and a potential for spread of the infection and or/the development of chronic liver disease.

Antiviral drugs such as interferon taken alone or in combination with ribavirin, can be used for the treatment of persons with chronic hepatitis C, but the cost of treatment is very high. Treatment with interferon alone is effective in about 10% to 20% of patients. Interferon combined with ribavirin is effective in about 30% to 50% of patients. Ribavirin does not appear to be effective when used alone.

There is no vaccine against HCV. Research is in progress but the high mutability of the HCV genome complicates vaccine development. Lack of knowledge of any protective immune response following HCV infection also impedes vaccine research. It is not known whether the immune system is able to eliminate the virus.

Some studies, however, have shown the presence of virus neutralizing antibodies in patients with HCV infection. In the absence of a vaccine, all precautions to prevent infection must be taken including (a) screening and testing of blood and organ donors; (b) Virus inactivation of plasma derived products; (c) implementation and maintenance of infection control practices in health care settings, including appropriate sterilization of medical and dental equipment; (d) promotion of behaviour change among the general public and health care workers to reduce overuse of injections and to use safe injection practices; and (e) Risk reduction counselling for persons with high-risk drug and sexual practices. “

The genome encodes for structural components, a nucleocapsid protein and two envelope glycoproteins, and functional constituents involved in the virus replication and protein processing. The nucleocapsid-encoding region seems to be the most conservative among the isolates obtained all over the world.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

Microplates are coated with HCV-specific antigens derived from “core” and “ns” regions encoding for conservative and immunodominant antigenic determinants (Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides).

The solid phase is first treated with the diluted sample and HCV Ab are captured, if present, by the antigens. After washing out all the other components of the sample, in the 2nd incubation bound HCV antibodies, IgG and IgM as well, are detected by the addition of polyclonal specific anti hlgG&M antibodies, labelled with peroxidase (HRP).

The enzyme captured on the solid phase, acting on the substrate TMB mixture, generates an optical signal that is proportional to the amount of anti HCV antibodies present in the sample. A cut-off value let optical densities be interpreted into HCV antibody negative and positive results.

D. COMPONENTS

The kit contains reagents for 96 tests (code 071067), 192 tests (code 071064), or 480 tests (code 071068).

Microplate	1
Negative Control	1x4 mL/vial
Positive Control	1x2 mL/vial
Calibrator	2 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	1x50 mL/vial
Conjugate	1x16 mL/vial
Sample Diluent	1x50 mL/vial
Substrate TMB	1x16 mL/vial
Stop Solution	1x15 mL/vial
Assay Diluent	1x8 mL/vial
Plate sealing foils	2
Number of tests	96
Code	071067

Microplate	2
Negative Control	2x4 mL/vial
Positive Control	1x4 mL/vial
Calibrator	3 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	2x50 mL/vials
Conjugate	2x16 mL/vials
Sample Diluent	2x50 mL/vials
Substrate TMB	2x16 mL/vials
Stop Solution	2x15 mL/vial
Assay Diluent	2x8 mL/vial
Plate sealing foils	4
Number of tests	192
Code	071064

Microplate	5
Negative Control	1x20 mL/vial
Positive Control	1x10 mL/vial
Calibrator	7 vials
Wash Buffer Concentrate 20x	5x50 mL/vials
Conjugate	2x40 mL/vial
Sample Diluent	5x50 mL/vials
Substrate TMB	2x40 mL/vials
Stop Solution	2x40 mL/vial
Assay Diluent	1x40 mL/vial
Plate sealing foils	10
Number of tests	480
Code	071068

1. Microplate

12 strips of 8 microwells coated with Core peptide, recombinant NS3, NS4 and NS5 peptides. Plates are sealed into a aluminium pouch with desiccant. Bring the microplate to room temperature (18...24°C) before opening the bag. Unused strips have to be returned into the pouch and the pouch has to be sealed and stored back to 2...8°C, in presence of the desiccant.

2. Negative Control

Ready to use control. It contains 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 2% casein as protein base and 0.1% Proclin 150 as preservative. The negative control is olive green colour coded.

3. Positive Control

Ready to use control. It contains 1% goat serum proteins, human antibodies positive to HCV, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide and 0.1% Proclin 150 as preservatives. The Positive Control is dark green colour coded.

Important Note: The absence of viable pathogens in the Positive Control can not be fully ensured, and therefore,

the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.

4. Calibrator

Lyophilized calibrator. To be dissolved with the volume of EIA grade water reported on the label. It contains foetal bovine serum proteins, human antibodies to HCV whose content is calibrated on the NIBSC Working Standard code 06/188-006, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL gentamicin sulfate and 0.1% Proclin 150 as preservatives.

Important Note: *The absence of viable pathogens in the Calibrator can not be fully ensured, and therefore, the reagent should be handled as potentially biohazardous, in accordance with good laboratory practices.*

Note: *The volume necessary to dissolve the content of the vial may vary from lot to lot. Please use the right volume reported on the label.*

5. Wash Buffer Concentrate 20x

20x concentrated solution. Once diluted, the wash solution (wash buffer diluted) contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 and 0.05% Proclin 150.

Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at 2...8°C.

6. Conjugate

Ready to use and red colour coded reagent. It contains Horseradish Peroxidase conjugated goat polyclonal antibodies to human IgG and IgM, 5% BSA, 10 mM Citrate buffer pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclin and 0.05% Tween 20 as preservatives.

7. Substrate TMB

Ready-to-use component. It contains 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H_2O_2 . Mix gently before use.

Note: *To be stored protected from light as sensitive to strong illumination.*

8. Assay diluent

Ready-to-use component. It contains goat serum, 10 mM tris buffered solution pH 8.0 ± 0.1 containing 0.1% Proclin 150 and 0.09% Na azide for the pre-treatment of samples and controls in the plate, blocking interference.

9. Stop Solution

Ready-to-use component.

It contains 0.3 M H_2SO_4 solution. Mix gently before use.

10. Sample Diluent

Ready-to-use component and dark green colour coded. It contains 1% casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 and 0.1% Proclin 150 as preservative.

To be used to dilute the sample.

Note: *The diluent changes colour from olive green to dark bluish green in the presence of sample.*

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (200 μ L and 10 μ L) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (bidistilled or deionised, charcoal treated to remove oxidizing chemicals used as disinfectants).
3. Timer with 60 minute range or higher.
4. Absorbent paper tissues.
5. Calibrated ELISA microplate thermostatic incubator capable to provide a temperature of +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and possibly with 620-630nm (blanking) filters.
7. Calibrated ELISA microplate washer.
8. Vortex or similar mixing tools.

F. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory. This package insert must be read carefully before product use.
2. Read carefully the Safety Data Sheet (SDS) before product use.
3. When the kit is used for the screening of blood units and blood components, it has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
4. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
6. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and microplates and when performing the test. Protect the Substrate (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
7. Upon receipt, store the kit at 2...8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
8. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
9. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
10. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample.
11. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one.

12. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
13. Treat all specimens as potentially infective. All human serum specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
15. Waste produced during the use of the kit has to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before waste. Suggested procedures of inactivation are treatment with a 10% final concentration of household bleach for 16-18 hrs or heat inactivation by autoclave at 121°C for 20 min.
16. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
17. The Stop Solution contains 0.3M sulphuric acid. Avoid contact with skin and eyes. In the event of contact, rinse immediately with plenty of water.
18. Dispose of reagent solutions containing sodium azide as preservatives according to all local, state and national regulations. To dispose of reagents containing azide, flush away using copious amounts of water. Dispose with caution as sodium azide can form explosive compounds on prolonged contact with lead or copper piping.
19. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas in which specimens or kit reagents are handled
20. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples and controls, used microplates) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.
21. Do not pipette by mouth.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECCOMANDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma or serum is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA and heparin.
2. Avoid any addition of preservatives to samples; especially sodium azide as this chemical would affect the enzymatic activity of the conjugate, generating false negative results.
3. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results. When the kit is used for the screening of blood units, bar code labeling and electronic reading is strongly recommended.

4. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
5. Sera and plasma can be stored at +2...8°C for up to five days after collection. For longer storage periods, samples can be stored frozen at -20°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may generate particles that could affect the test result.
6. If particles are present, centrifuge at 2.000 rpm for 20 min or filter using 0.2-0.8µ filters to clean up the sample for testing.

H. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

A study conducted on an opened kit has not pointed out any relevant loss of activity up to 1 re-use of the device and up to 6 months.

1. Microplates:

Allow the microplate to reach room temperature (about 1 hr) before opening the pouch. Check that the desiccant has not turned to dark green, indicating a defect in manufacturing. In this case, call Adaltis's customer service.

Unused strips have to be placed back inside the aluminium pouch, with the desiccant supplied, firmly zipped and stored at +2...8°C. After first opening, remaining strips are stable until the humidity indicator inside the desiccant bag turns from yellow to green.

2. Negative Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

3. Positive Control:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Handle this component as potentially infectious.

4. Calibrator:

Dissolve carefully the content of the lyophilised vial with the volume of EIA grade water reported on its label. Mix well on vortex before use.

Handle this component as potentially infectious.

Note: When dissolved the Calibrator is not stable. Store in aliquots at -20°C.

5. Wash Buffer Concentrate 20x (vial of 50 mL):

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with EIA grade water up to 1000 mL (the volume is reported on the label) and mixed gently end-over-end before use. As some salt crystals may be present into the vial, take care to dissolve all the content when preparing the solution. During preparation avoid foaming as the presence of bubbles could impact on the efficiency of the washing cycles.

Note: Once diluted, the wash solution is stable for 1 week at +2...8°C.

6. Conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Be careful not to contaminate the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. If this component

has to be transferred use only plastic, possibly sterile disposable containers.

7. Substrate TMB:

Ready to use. Mix well on vortex before use. Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, air-driven dust or microbes. Do not expose to strong illumination, oxidizing agents and metallic surfaces. If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container.

8. Assay Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

9. Stop Solution:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

10. Sample Diluent:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

I. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. Micropipettes have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample or the components of the kit. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. The ELISA incubator has to be set at $+37^{\circ}\text{C}$ (tolerance of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) and regularly checked to ensure the correct temperature is maintained. Both dry incubators and water baths are suitable for the incubations, provided that the instrument is validated for the incubation of ELISA tests.
3. The ELISA washer is extremely important to the overall performances of the assay. The washer must be carefully validated and correctly optimized. Usually 4-5 washing cycles (aspiration + dispensation of $350\ \mu\text{L}/\text{well}$ of washing solution = 1 cycle) are sufficient to ensure that the assay performs as expected. A soaking time of 20-30 seconds between cycles is suggested. In order to set correctly their number, it is recommended to run an assay with the kit controls/calibrator and well-characterized negative and positive reference samples, and check to match the values reported below in sections O "Internal Quality Control". Regular calibration of the volumes delivered and maintenance (decontamination and cleaning of needles) of the washer has to be carried out according to the instructions of the manufacturer.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
 - ✓ Short Incubation Method (for 1st / 2nd incubation tolerance between 43 min to 47 min; for 3rd incubation tolerance between 14 and 16 min).
 - ✓ Standard Incubation Method (for 1st incubation tolerance between 57 min to 63 min; for 2nd and 3rd incubation tolerance between 29 and 31 min).
5. The ELISA microplate reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and ideally with a second

filter (620-630nm) for blanking purposes. Its standard performances should be (a) bandwidth $\leq 10\ \text{nm}$; (b) absorbance range from 0 to ≥ 2.0 ; (c) linearity to ≥ 2.0 ; repeatability $\geq 1\%$. Blanking is carried out on the well identified in section "Assay Procedure". The optical system of the reader has to be calibrated regularly to ensure that the correct optical density is measured. It should be regularly maintained according to the manufacturer's instructions.

6. When using an ELISA automated work station, all critical steps (dispensation, incubation, washing, reading, shaking, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in sections O "Internal Quality Control". The assay protocol has to be installed in the operating system of the unit and validated as for the washer and the reader. In addition, the liquid handling part of the station (dispensation and washing) has to be validated and correctly set. Particular attention must be paid to avoid carry over by the needles used for dispensing samples and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells due to strongly reactive samples, leading to false positive results. The use of ELISA automated work stations is recommended for blood screening and when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the Substrate TMB is colorless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile transparent plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box. Check that the aluminum pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Buffer as described above.
4. Dissolve the Calibrator as described above.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix as described.
6. Set the ELISA incubator at $+37^{\circ}\text{C}$ and prepare the ELISA washer by priming with the diluted wash solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as found in section I.3.
7. Check that the ELISA reader has been turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated workstation, turn it on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
9. Check that the micropipettes are set to the required volume.
10. Check that all the other equipment is available and ready to use.
11. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

M. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported below, taking care to maintain the same incubation time for all the samples in testing.

The Assay Procedure can be done with two times incubation procedures. Choose the one that is required by your regulation:

1. Standard Incubation (1st incubation 60 minutes, 2nd and 3rd incubation 30 minutes)
2. Short Incubation (1st and 2nd incubation 45 minutes, 3rd incubation 15 minutes)

1. Standard Incubation - Manual assay:

1. Place the required number of microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **60 min at +37°C**.
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted wash solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **30 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the microplate at room temperature (18...24°C) for **30 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will

turn the positive control and positive samples from blue to yellow.

12. Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

Important notes:

1. If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
2. Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
3. Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

2. Short Incubation - Manual assay:

1. Place the required number of Microwells in the microwell holder. Leave the 1st well empty for the operation of blanking.
2. Dispense 200 µL of Negative Control in triplicate, 200 µL Calibrator in duplicate and 200 µL Positive Control in single in proper wells. Do not dilute Controls and Calibrator as they are pre-diluted, ready to use!
3. Add 200 µL of Sample Diluent to all the sample wells; then dispense 10 µL sample in each properly identified well. Mix gently the plate, avoiding overflowing and contaminating adjacent wells, in order to fully disperse the sample into its diluent.

Important note: Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.

4. Dispense 50 µL Assay Diluent into all the controls/calibrator and sample wells. Check that the color of samples has turned to dark blue.
5. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, supplied, only when the test is carried out manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.
6. Wash the microplate with an automatic washer by delivering and aspirating 350 µL/well of diluted washing solution as reported in section I.3.
7. Pipette 100 µL Enzyme Conjugate into each well, except the 1st blanking well, and cover with the sealer. Check that this red coloured component has been dispensed in all the wells, except A1.

Important note: Be careful not to touch the plastic inner surface of the well with the tip filled with the Enzyme Conjugate. Contamination might occur.

8. Incubate the microplate for **45 min at +37°C**.
9. Wash microwells as reported in section I.3.
10. Pipette 100 µL Substrate TMB mixture into each well, the blank well included. Then incubate the

microplate at room temperature (18...24°C) for **15 minutes**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

- Pipette 100 µL Stop Solution into all the wells using the same pipetting sequence as in step 10 to stop the enzymatic reaction. Addition of stop solution will turn the positive control and positive samples from blue to yellow.
- Measure the colour intensity of the solution in each well, as described in section I.5, at 450nm filter (reading) and possibly at 620-630nm (background subtraction), blanking the instrument on A1.

Important notes:

- If the second filter is not available, ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading at 450nm. Finger prints could generate false positive results on reading.
- Reading has should ideally be performed immediately after the addition of the Stop Solution but definitely no longer than 20 minutes afterwards. Some self oxidation of the substrate can occur leading to a higher background.
- Shaking at 350 ±150 rpm during incubation has been proved to increase the sensitivity of the assay of about 20%.

N. ASSAY SCHEME

Method	Operations (Standard Incubation)	Operations (Short Incubation)
Controls & Calibrator	200 µL	200 µL
Sample Diluent & Sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample	200 µL diluent.+ 10 µL sample
Assay Diluent	50 µL	50 µL
1st incubation	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL
2nd incubation	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperature	+37°C	+37°C
Wash step	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrate TMB	100 µL	100 µL
3rd incubation	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperature	Room temperature (18...24°C)	Room temperature (18...24°C)
Stop Solution	100 µL	100 µL
Reading OD	450/620nm	450/620nm

An example of dispensation scheme is reported below (valid for both incubation time procedures):

Microplate

	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										

Legenda: BLK = Blank NC = Negative Control
CAL = Calibrator PC = Positive Control S = Sample

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A check is carried out on the controls and the calibrator any time the kit is used in order to verify whether their OD450/620nm values are as expected and reported in the table below.

Check	Requirements
Blank well	< 0.100 OD 450/620nm value
Negative Control (NC)	< 0.050 mean OD450/620nm after blanking
Calibrator	S/Co >1.1
Positive Control	>1.000 OD450/620nm value

If the results of the test match the requirements stated above, proceed to the next section. If they do not, do not proceed any further and perform the following checks:

Problems	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Substrate solution has not become contaminated during the assay
Negative Control (NC) > 0.050 OD450nm after blanking	1. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 2. that the proper washing solution has been used and the washer has been primed with it before use; 3. that no mistake has been done in the assay procedure (dispensation of positive control instead of the negative one); 4. that no contamination of the negative control or of the wells where the control was dispensed has occurred due to spills of positive samples or of the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Calibrator S/Co<1.1	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of negative control instead of calibrator) 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the calibrator has occurred.
Positive Control <1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the control (dispensation of negative control instead of positive control. In this case, the negative control will have an OD450nm value > 0.150,too. 3. that the washing procedure and the washer settings are as validated in the pre qualification study; 4. that no external contamination of the positive control has occurred.

If any of the above problems have occurred, report the problem to the supervisor for further actions.

P. RESULTS

The tests results are calculated by means of a cut-off value determined with the following formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC mean} + 0.350$$

The value found for the test is used for the interpretation of results as described in the next paragraph.

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Test results are interpreted as ratio of the sample OD450nm and the Cut-Off value (or S/Co) according to the following table:

S/Co	Interpretation
< 0.9	Negative
0.9 - 1.1	Equivocal
> 1.1	Positive

A negative result indicates that the patient has not been infected by HCV or that the blood unit may be transfused. Any patient showing an equivocal result should be tested again on a second sample taken 1-2 weeks later from the patient and examined. The blood unit should not be transfused.

A positive result is indicative of HCV infection and therefore the patient should be treated accordingly or the blood unit should be discarded.

Important notes:

1. Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
2. Any positive result should be confirmed by an alternative method capable to detect IgG and IgM antibodies (confirmation test) before a diagnosis of viral hepatitis is formulated.
3. As proved in the Performance Evaluation of the product, the assay is able to detect seroconversion to anti HCV core antibodies **earlier** than some other commercial kits. Therefore a positive result, not confirmed with these commercial kits, does not have to be ruled out as a false positive result ! The sample has to be anyway submitted to a confirmation test.
4. As long as the assay is able to detect also IgM antibodies some discrepant results with other commercial products for the detection of anti HCV antibodies - lacking anti hIgM conjugate in the formulation of the enzyme tracer and therefore missing IgM reactivity - may be present. The real positivity of the sample for antibodies to HCV should be then confirmed by examining also IgM reactivity, important for the diagnosis of HCV infection.
5. When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.
6. Diagnosis of viral hepatitis infection has to be done and released to the patient only by a qualified medical doctor.

An example of calculation is reported below:

The following data must not be used instead of real figures obtained by the user.

Negative Control: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm
 Mean Value: 0.020 OD450nm Lower than 0.050 – Accepted

Positive Control: 2.189 OD450nm
 Higher than 1.000 – Accepted

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370
 Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm
 Mean value: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4
 S/Co higher than 1.1 – Accepted

Sample 1: 0.070 OD450nm
 Sample 2: 1.690 OD450nm
 Sample 1 S/Co < 0.9 = negative
 Sample 2 S/Co > 1.1 = positive

R. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC) and with both incubation procedures (standard and short).

1. LIMIT OF DETECTION

The limit of detection of the assay has been calculated using the short incubation assay by means of the British Working Standard for anti-HCV, NIBSC code 06/188-006. The table below reports the mean OD450nm values of this standard when diluted in negative plasma and then examined.

Dilution	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
Negative Plasma	0,25	0,20	0,20

In addition the sample coded Accurun 1 - series 3000 - supplied by Boston Biomedica Inc., USA, has been evaluated "in toto" showing the results below:

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. DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The Performance Evaluation of the device was carried out in a trial conducted on more than total 5000 samples.

2.1 Diagnostic specificity

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of specific analyte. A total of more 5000 unselected donors, including 1st time donors, were examined.

The diagnostic specificity was assessed against a kit US FDA approved.

5043 blood donors were tested providing a specificity of 99.5%. 210 hospitalized patients were tested for HCV Ab; a diagnostic specificity of 99.5% was found.

Moreover, diagnostic specificity was assessed by testing 162 potentially interfering specimens (other infectious diseases, E.coli antibody positive, patients affected by non viral hepatic diseases, dialysis patients, pregnant women, hemolized, lipemic, etc.). A value of specificity of 100% was assessed.

No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed. Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been used to determine the value of specificity. Frozen specimens have been tested, as well, to check for interferences due to collection and storage. No interference was observed.

2.2 Diagnostic Sensitivity

It defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of specific analyte. The diagnostic sensitivity has been assessed externally on a total number of 348 specimens; a diagnostic sensitivity of 100% was found. Internally more than other 50 positive samples were tested, providing a value of diagnostic sensitivity of again 100%. Positive samples from infections carried out by different genotypes of HCV were tested as well.

Furthermore, most of seroconversion panels available from Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) and Zeptomatrix, USA, (HCV) have been studied.

Results are reported below for some of them.

Panel	N° samples	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

Note:

1. Positive samples detected
2. HCV v.3.0

Finally the Product has been tested on the panel EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, supplied by the Etablissement Francais Du Sang (EFS), France, with the following results:

EFS Panel Ac HCV

sample	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Average value
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

3. PRECISION

It has been calculated on five samples, one negative and four positives examined in 4 replicates each in six separate runs. The precision, obtained for both protocols, is equivalent.

Results are reported as follows:

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.03	6.66	10.56	12.48
Positives	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

Intra-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st Lot (long incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	S/Co Mean	Within Run	Between Run	Total
Negative	0.04	4.67	12.34	13.19
Positives	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

Inter-lot results: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1st, 2nd and 3rd Lot (short incubation assay)

		Precision - %CV		
Sample	Lot 1	Lot 2	Lot 3	
Negative	8,65	8,29	6,13	
Calibrator	4,98	4,44	5,38	
Positive	4,11	3,11	1,37	

The variability shown in the tables above did not result in sample misclassification.

S. SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different ($\pm 50\%$) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) -incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation) -error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) -contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> -not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) -error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) -contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers) -pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)
no colorimetric reaction after addition of substrate	<ul style="list-style-type: none"> -some reagent not pipetted - strong contamination of Conjugate or Substrate -errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)
too low reaction (too low ODs)	<ul style="list-style-type: none"> -incubation time too short, incubation temperature too low -incorrect conjugate dilution
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> -incorrect conjugate dilution -incubation time too long, incubation temperature too high -water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization) -insufficient washing (conjugates not properly removed)
unexplainable outliers	<ul style="list-style-type: none"> -contamination of pipettes, tips or containers -inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> -reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temperature prior to use - plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> -incubation conditions not constant (time, temperature) -controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order) -person-related variation

T. AUTOMATION

The procedures identified in this Instruction for Use are for manual testing only. When using automated instruments, follow the procedures that are contained in the operator's manual provided by the device manufacturer. Laboratories must follow their approved validation procedures to demonstrate compatibility of this product on automated systems.

U. LIMITATIONS

Repeatable false positive results, not confirmed by RIBA or similar confirmation techniques, were assessed as less than 0.1% of the normal population.

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates after thawing have been observed to generate some false results.

BIBLIOGRAPHY

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Прочетете внимателно тази листовка, преди да извършите дозирането и се придържайте стриктно към инструкциите, които са представени.

Надеждността на резултатите е гарантирана единствено, ако инструкциите бъдат следвани внимателно.



Производител:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

Тел. +39-0774-5791 - Факс +39-0774-353085

www.adaltis.net

bg

СИМВОЛИ, ИЗПОЛЗВАНИ В ЕТИКЕТТЕ

Български BG							
	Медицински Продукт Диагностика ин витро	Номер на Каталог	Номер на Партида	Внимание, прочетете инструкциите за употреба	Граници на Температура	Използвайте До	Номер на Тест
	Производител	Пазете от Слънчева Светлина	Дата на Производство	Микроплата	Положителна Контрола	Отрицателна Контрола	Калибратор
	Свързан	Разтворител Мостри	Субстрат TMB	Блокиращ (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Тампон за Концентрирано Измиване 20x	Разтворител за Анализ	Допълнете с x mL
	Биологичен риск	Опасност	Внимание				

Внимание:

Блокиращ Разтвор класифициран като: Разяждане на кожата 1A



- **Предупреждение:**
Опасност
- **Опасни компоненти, които определят етикетиранието:**
Сярна киселина
- **Указания за опасност:**
H314 Причинява тежки кожни изгаряния и увреждане на очите.
- **Препоръки за предпазливост:**
P260 Не вдъшвайте прахове, дим, газ, мъгла, изпарения, аерозоли.
P303+P361+P353 ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА (или косата): Незабавно свалете цялото замърсено облекло. Изплакнете кожата с вода / вземете душ.
P305+P351+P338 В СЛУЧАЙ НА КОНТАКТ С ОЧИТЕ: изплакнете обилно в продължение на няколко минути. Свалете, ако се използват, контактни лещи, ако това е възможно. Продължете да изплаквате.
P310 Потърсете незабавно ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или медицинска помощ.
P405 Съхранявайте под ключ.
P501 Изхвърлете съдържанието на контейнера в съответствие с локалните, регионалните, националните, международните разпоредби.

Внимание:

Отрицателна Контрола, Положителна контрола, Калибратор, Конюгат, Разтворител Мостри, Разтворител на Анализа и Тампон за Концентрирано измиване 20X класифицирани като: Чувств. за кожата. 1



- **Предупреждение:**
Внимание
- **Опасни компоненти, които определят етикетиранието:**
Смес от: 5-хлор-2-метил-2Н-изотиазол-3-он [ЕС номер 247-500-7]; 2-метил-2Н-изотиазол-3-он [ЕС номер 220-239-6] (3:1)
- **Указания за опасност:**
H317 Може да причини алергична кожна реакция.
- **Препоръки за предпазливост:**
P261 Избягвайте вдъшването на прах, дим, газ, мъгла, изпарения, аерозоли.
P280 Използвайте предпазни ръкавици, предпазно облекло. Пазете очите, лицето.
P321 Специално третиране (виж на този етикет).
P333+P313 В случай на раздразнение на кожата или разкъсване, направете : консултация с лекар.
P302 + P352 ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно с вода.
P501 Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с локалните/регионалните/националните/международните разпоредби.

За листовките за Безопасност се консултирайте: www.adaltis.net.

А. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Имуноензимно дозиране (ELISA) от четвърта генерация за определяне на антитела анти Вирус на Хепатит С in плазми (EDTA, Хепарин и Цитрат) и човешки серуми. Комплектът може да бъде използван за търсене на антитела в кръвните проби на пациенти, заразени от HCV.

Само за диагностична употреба in vitro.

В. ВЪВЕДЕНИЕ

Световната Организация на Здравеопазването (OMS) определя инфекцията от Хепатит С по следния начин:

“Хепатит С е вирусна инфекция на черния дроб, която спада към хепатити “А и В” парентерално предадени до идентифициране на агента причинител през 1989. Откритието и характеризирането на вируса на хепатит С (HCV) води до разбиране за неговата първична роля при хепатитите след преливане на кръв и да води до трайни инфекции”.

HCV се предава основно при директен контакт с човешка кръв. Най-големите причини за HCV в света са употребата на кръв, която не е проверена за преливания и повторната употреба на игли и спринцовки, неподходящо стерилизирани.

В момента не е налична нито една ваксина, която да предотврати хепатит С и лечението на хронични хепатити С е прекалено скъпо, за да могат народите от развиващите се страни, да могат да си го позволят. Следователно, най-голямото въздействие върху болните от хепатит С ще бъде постигнато насочвайки усилията върху намаляване на рисковете на предаването на HCV в болница (преливане на кръв, несигурни инжекции) и поведение с висок риск (инжектиране на дроги).

Вирусът на хепатит С (HCV) е един от вирусите (А, В, С, D, и E), които са отговорни за увеличаването на случаите на вирусен хепатит. Това е един вирус RNA от семейството Flaviviridae, което показва, че има тесен спектър на приемници. Човешките същества и шимпанзетата са единствените видове, склонни към инфекция и двата вида развиват едни и същи болести. Една важна характеристика на вируса е относителната мутагенност на генома, което вероятно се свързва с високата мутагенност (80%) и предизвиква хронични инфекции. HCV е обединен с различни точно разграничени генотипи, които могат да бъдат важни при определянето на болестта и повлияване на лечение.

Инкубационният период на инфекция от HCV преди появяването на клиничните симптоми е от 15 до 150 дни. При острите инфекции, най-общите симптоми са умора и жълтеница в по-голямата част от случаите (между 60% и 70%), случаите които развиват хронична инфекция, протичат без симптоми. Около 80% от новите инфектирани пациенти развива хронична инфекция. Цирозите се развиват приблизително от 10 % до 20% в хора, които имат хронична инфекция, докато рак на черния дроб се появява между 1% и 5% от хората, които имат хронична инфекция за един период от 20 до 30 години. По-голямата част от пациентите, които страдат от рак на черния дроб, при които няма инфекция от хепатит В, показват инфекция от HCV. Механизмът, поради който инфекцията от HCV води до рак на черния дроб все още не е много ясен. Хепатит С увеличава сериозността на заболяванията

на черния дроб, когато е препокрива с други заболявания на черния дроб. По-специално, чернодробните заболявания се развиват по-бързо при лица с чернодробни заболявания, предизвикани от прекомерна употреба на алкохол и с инфекция от HCV. HCV се предава основно при директен контакт с инфектирана кръв. Предаването посредством преливане на кръв, не изследвана за HCV, повторната употреба на игли, спринцовки и други медицински изделия, неподходящо стерилизирани, или посредством размяна на игли между хора, употребяващи дрога. Предаването по сексуален или перинатален път, може също да се получи, но не толкова често. Други начини за предаване, са свързани с практики на поведение, социални, културни (пирсинг по тялото, обрязване и татуировки) могат да настъпят, ако се използват неподходящо стерилизирани инструменти. HCV не се предава посредством кихане, прегръдки, кашлица, храна или вода, като и чрез споделяте прибори или чаши или чрез случаен контакт.

Както в развитите страни, така и в развиващите се, групите под висок риск включват потребителите на дрога за инжектиране, получателите на непроверена кръв, хемофилици, които са подложени на диализа и лица с голям брой сексуални партньори. В развитите страни, се предполага, че 90% от хората с хронична инфекция от HCV, са основно потребители на дроги за инжектиране и тези с история на преливане на не изследвана кръв или кръвни продукти. В по-голяма част от развиващите се страни, където все още се използва не изследвана кръв и производни, основното средство за предаване на инфекцията са инструментите за инжектиране и преливане на не контролирана кръв. В допълнение, хората, които практикуват жертвени ритуали и обрязване са изложени на риск, ако използват или използват повторно не стерилизирани инструменти.

OMS предвижда, че около 170 милиона човека, 3% от световното население са заразени от HCV и са изложени на риск от развиване на цироза и/или рак на черния дроб. Разпространението на инфекцията HCV в Африка, Средния Изток, Югоизточна Азия и Западната част на Тихия океан е високо, в сравнение със Северна Америка и Европа.

Диагностичните тестове за HCV се използват, за да се избегне инфекцията посредством скрининг на донори на кръв и плазма, за да се стабилизира клиничната диагноза и да се взимат по-добре решения, относно лечението на пациентите. Диагностичните тестове налични днес, се основават на имуноензимни анализи (EIA) за откриване на специфични антитела на HCV. Системата EIA може да отчете повече от 95% от пациентите, хронично инфектирани, но само от 50% до 70% от острите случаи на инфекции. Рекомбинантен имуоблот анализ (RIBA), който идентифицира антителата, които реагират с индивидуални антигени HCV, често се използва като един допълнителен тестове за потвърждаването на положителен резултат EIA. Тест за HCV, базирани върху разпространяването на RNA (пр. PCR, анализ на свързано DNA) е използван също така и за потвърждение на серологичния резултат и за предписване на една ефикасна антивирусна терапия. Положителения резултат показва наличието на активна инфекция и възможност за разпространяване на инфекцията и/или развиването на хронични заболявания на черния дроб.

Противовирусни медикаменти, като интерферон, приеман самостоятелно или в комбинация с

рибавирин, може да се използва за лекуване на лица с хроничен хепатит С, но разходите по лечението са много високи. Лечението само с интерферон е ефикасно в около 10%-20% от пациентите. Интерферонът, комбиниран с рибавирин е ефикасен в 30%-50% от пациентите. Рибавиринът не е ефективен, когато се използва самостоятелно.

Няма никаква ефикасна ваксина срещу HCV. Научните изследвания продължават, но високата мутагенност на генома на HCV усложнява разработването на ваксина. Липсата на познаване на някои от имуно-защитните отговори след инфекция на HCV не позволява също така търсене на ваксина. Дори не се знае дали имунната система е в състояние да отстрани вируса.

Някое от проучванията, независимо от това е показало наличието на антитела неутрализиращи вируса при пациентите, заразени от HCV. При липса на ваксина, трябва да бъдат взети всички предпазни мерки, за да се избегне инфекцията, включително (а) скрининг и тест на кръвта и органите; (б) деактивиране на вируса на плазми и други продукти; (в) нарастване и поддържане на контрола на инфекцията, както и правилната стерилизация на медицинските и дентални инструменти; (г) насърчаването за промени в поведението между обикновените хора, за да се намали прекомерната употреба на инжекции и практиката за използване на необезопасени инжекции; (е) намаляването на риска за лица, които употребяват дрога и практикуват секс без използване на предпазни средства.

Геномът, код за структурните компоненти, един нуклеокапсиден протеин и гликопротеини на обвивката, и функционалните съставки, участващи в повтаряемостта на вируса и в преработката на неговите протеини. Нуклеокапсидният кодиращ регион изглежда, че е най-консервативен между изолираните, постигнати в света.

C. НАЧАЛО НА ТЕСТА

Микроплочките са покрити с антигени HCV-специфични, произхождащи от регионите "core" и "ns" кодиращи за консервативите и имунодоминантните антигенни детерминанти (Core peptide, рекомбинантен NS3, NS4 и NS5 пептиди). Основната част първо се третира с разрежена мостра и антителата HCV са хванати, ако са налични, от антигените. След като са измити всички други компоненти на мострата, при втората инкубация, свързани антителата HCV, IgG и IgM са открити от добавянето на специфични антитела, поликлонирани анти IgG&M, етикетирани с пероксидаза (HRP). Хванатият ензим върху солидна основа, реагирайки със субстратната смес TMB, генерира оптичен сигнал, който е пропорционален на количеството антитела анти HCV налични в мострата. Стойността на cut-off позволява да се интерпретират оптичните плътности в положителни и отрицателни резултати в антитела HCV.

D. КОМПОНЕНТИ

Комплектът съдържа реагенти за 96 теста (код 071067), 192 теста (код 071064), или 480 теста (код 071068).

Микроплата	1
Отрицателна Контрола	1x4 mL/флакон
Положителна Контрола	1x2 mL/флакон
Калибратор	2 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	1x50 mL/флакон
Свързан	1x16 mL/флакон
Разтворител на Мостри	1x50 mL/флакон
Субстрат TMB	1x16 mL/флакон
Блокиращ	1x15 mL/флакон
Разтворител за Анализ	1x8 mL/флакон
Лист за покриване на плоча	2
Брой тестове	96
Код	071067

Микроплата	2
Отрицателна Контрола	2x4 mL/флакона
Положителна Контрола	1x4 mL/флакон
Калибратор	3 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	2x50 mL/флакона
Свързан	2x16 mL/флакона
Разтворител на Мостри	2x50 mL/флакона
Субстрат TMB	2x16 mL/флакона
Блокиращ	2x15 mL/флакона
Разтворител за Анализ	2x8 mL/флакона
Лист за покриване на плоча	4
Брой тестове	192
Код	071064

Микроплата	5
Отрицателна Контрола	1x20 mL/флакон
Положителна Контрола	1x10 mL/флакон
Калибратор	7 флакона
Разтвор за Измиване конц. 20x	5x50 mL/флакона
Свързан	2x40 mL/флакона
Разтворител на Мостри	5x50 mL/флакона
Субстрат TMB	2x40 mL/флакона
Блокиращ	2x40 mL/флакона
Разтворител за Анализ	1x40 mL/флакон
Лист за покриване на плоча	10
Брой тестове	480
Код	071068

1. Микроплата

12 лентички 8 микроелементи, покрити с ядрен пептид, рекомбинантен NS3, NS4 и NS5 пептиди. Пластините са запечатани в един алуминиев плик. Изчакайте микроплочата да се загрее на стайна температура (18...24°C) преди да отворите плика. Заредете неизползваните ленти в плика и съхранявайте на 2...8°C.

2. Отрицателна Контрола

Проверка на готов за употреба продукт. Съдържа тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0 ± 0.1, 2% казеин и 0.1% Проклин 150 като консервант. Отрицателната проверка е кодирана с маслено зелен цвят.

3. Положителна Контрола

Проверка на готов за употреба продукт. Съдържа 1% протеини от кози серум, човешки антитела, положителни на HCV, тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% натриев азид и 0.1% Проклин 150 като консерванти. Положителна Контрола е кодирана с тъмно зелен цвят.

Важна забележка: Отсъствието на жизнени патогени агенти в Положителна Контрола, не може да бъде напълно гарантирано и следователно, реагентът трябва да бъде третиран като

потенциално инфектиран, в съответствие с добрите лабораторни практики.

4. Калибратор

Разтворим калибратор. Трябва да се разтвори с обем вода, степен EIA представен на етикета. Съдържа протеини от фетален волски серум, човешки антитела на HCV чието съдържание е калибрирано на базата NIBSC Working Standard код 06/188-006, 10mM тампон натриев цитрат с pH 6.0±0.1, 0.3 mg/mL гентамицин солфат и 0.1% Проклин 150 като консерванти.

Важна забележка: Отсъствието на жизнени патогени агенти в Калибратора, не може да бъде напълно гарантирано, и следователно, реагентът трябва да бъде третиран като потенциално инфектиран, в съответствие с добрите лабораторни практики.

Забележка: обемът, необходим, за да се разтвори съдържанието на епруветката може да се различава от партида до партида. Моля, използвайте правилния обем, представен на етикета.

5. Концентриран Разтвор за Измиване 20x

Концентриран разтвор 20X. След разреждане, разтворът за измиване (разреден тампон за измиване) съдържа тампон фосфат 10 mM с pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 и 0.05% Проклин 150.

След разреждане, разтворът за измиване остава стабилен за 1 седмица на 2...8°C.

6. Свързан

Реагент готов за употреба и кодиран с червен цвят. Съдържа пероксидаза от хрян, свързана с антитела поликлонали от коза с IgG и човешки IgM, 5% BSA, тампон Цитрат 10 mM с pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Проклин и 0.05% Tween 20 като консерванти.

7. Субстрат TMB

Компонент готов за употреба продукт. Съдържа тампон цитрат-фосфат 50 mM с pH 3.5-3.8, диметил сулфоксид на 4%, 0.03% тетраметилбензидин (TMB) и 0.02% водороден пероксид (H₂O₂). Смесете внимателно преди употреба.

Забележка: Трябва да бъде съхраняван защитен от светлина, тъй като е чувствителен на силна светлина.

8. Разтворител за Анализ

Компонент готов за употреба продукт. Съдържа кози серум, буферирани разтвор на Tris 10mM с pH 8.0±0.1, съдържащ 0.1% Проклин 150 и 0.09% натриев азид за предварително третиране на мострите и на проверките в плоча, блокирайки смущенията.

9. Блокерац

Компонент: готов за употреба продукт. Съдържа един разтвор 0.3 M на H₂SO₄. Смесете внимателно преди употреба.

10. Разтворител Мостра

Компонент: готов за употреба и кодиран с тъмно зелен цвят. Съдържа 1% казеин, тампон натриев цитрат 10 mM с pH 6.0 ± 0.1 и 0.1% Проклин 150 като консервант.

Използвайте, за да разредит мострата.

Забележка: Разтворителят сменя цвета си от маслено зелен до тъмно зелено-син при наличие на мострата.

E. ИЗИСКАНИ МАТЕРИАЛИ, НО НЕ ДОСТАВЕНИ

1. Калибрирани микро-капкомери (200 µL и 10 µL) и игли за еднократна употреба.
2. Вода от степен EIA (двойно дестилирана или дейонизирана, обработена с активен въглен за да се отстранят химичните оксиданти, използвани като дезинфектанти).
3. Таймер с интервал от време 60 мин. или повече.
4. листов абсорбираща машина.
5. Термостатичен инкубатор за микроплочи ELISA, в състояние на предостави една температура от +37°C.
6. Калибриран четец на микроклетки ELISA с раззитане на 450nm по възможност с филтри на 620-630nm за определяне на празните клетки.
7. Калибрирано устройство за измиване на микроплочи ELISA.
8. Vortex или подобни инструменти за смесване.

F. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

1. Комплектът трябва да бъде използван само от специализиран технически персонал и правилно обучен, под наблюдението на отговорния лекар от лабораторията. Прочетете внимателно тази листовка, преди да извършите дозирането и се придържайте стриктно към инструкциите, които са представени.
2. Прочетете внимателно Листовката за Безопасност (SDS) преди да извършите дозирането.
3. Когато комплектът е използван за скрининг на кръвна проба и компоненти на кръвта, трябва да бъде използвана лаборатория със сертификат и квалифицирана от националния орган в тази сфера (Министерство на Здравеопазването или подобен), за да се извършат този тип анализи.
4. Целият персонал, участващ в извършването на анализа, трябва да носи защитни облекла за лаборатория, ръкавици от латекс без талк и очила. Употребата на всякакви остри устройства (игли) или режещи (остриета) трябва да бъде избегната. Целият участващ персонал, трябва да бъде обучен за процедурите за лична безопасност, както се препоръчва от Центъра за Контрол на Заболяванията в Atlanta, US. и представен в публикация на Националния Институт за Здравеопазване: "Лична безопасност в Микробиологичните и Био-медицински лаборатории", изд. 1984.
5. Целият персонал, ангажиран при боравенето с мострите трябва да бъде ваксиниран за HBV и HAV, поради което са налични сигурни и ефикасни ваксини.
6. Помещението на лабораторията трябва да бъде проверено, за да се избегнат замърсявания от прах и микробиологични агенти във въздуха, когато се отварят епруветките и микроплочата на комплекта и когато се извършва теста. Защитете хромоген/субстрата TMB от силната светлина и избягвайте вибрациите на работния плот, след започване на теста.
7. От получаването, съхранявайте комплекта на 2...8°C в хладилник или студена камера на контролирана температура.
8. Не сменяйте компонентите между различни партиди на комплекта. Препоръчва се да не се разменят компонентите на два комплекта от една и съща партида.
9. Проверете дали реагентите са ясни и не съдържат големи количества частици или агрегати. Ако това се случи, предупредете наблюдателя на лабораторията, за да се започнат необходимите процедури за смяна на комплекта.
10. Избягвайте кръстосани замърсявания между мостри на серуми и плазми използвайки остриета за еднократна употреба и ги сменяйте след всяка мостра.

11. Избягвайте кръстосани замърсявания между реагентите на комплекта използвайте остриета за еднократна употреба и ги сменяйте за употребата на всеки компонент.
12. Не използвайте комплекта след датата на срока на годност, отбелязана върху вътрешната опаковка и върху етикета на всяка отделна епруветка във вътрешността.
13. Третирайте всички мостри като потенциално инфектирани. Всички човешки серуми трябва да бъдат третирани според Ниво 2 на Био-Безопасност, както е препоръчано от центъра за Контрол на Заболяванията, Atlanta, US. заедно с представеното от публикацията на института за Здравеопазване: "Био-Безопасност в Микробиологичните и Био-медицински лаборатории", изд. 1984.
14. Употребата на пластмасови съдове за еднократна употреба се препоръчва за приготвянето на течните компоненти или за компонентите, прехвърлени в автоматизирани станции, за да се избегнат кръстосани заразявания.
15. Отпадъчните продукти по време на употребата на комплекта трябва да бъдат разтоварвани съгласно националните директиви и закони, отнасящи се до отпадъци от химични вещества и биологични отпадъци от лаборатории. По-специално, течните отпадъци, генерирани от процедурата на измиване, остатъци от изследвания и от мостри трябва да бъдат третирани като потенциално опасни материали и обезвредени преди да бъдат изхвърлени. Препоръчва се да се обезвредят с разтвор от натриев хипохлорид на 10% за 16-18 часа или деактивиране с обработка в автоклав на 121°C за 20 минути.
16. Случайни разсипвания на мострите по време на операциите трябва да бъдат поети от листовите хартия, напоени с натриев хипохлорит и след това изплакнати с вода. Листовите хартия след това трябва да се изхвърлят в специален контейнер за отпадъци на биологични материали.
17. Блокиращият разтвор съдържа сярна киселина 0.3 M. Избягвайте контакт с кожата и очите. В случай на контакт, изплакнете веднага и обилно с вода.
18. Реактивните разтвори, които съдържат натриев азид или тимерозал като консерванти, трябва да бъдат третирани, следвайки инструкциите и ответните закони, действащи в Държавата, в която се работи. Отстраняването на разтворите, съдържащи натриев азид, предвижда употребата на течаща вода в големи количества. Обърнете внимание на факта, че натриевият азид може да образува експлозивни смеси при продължителен контакт с олово и мед.
19. Не пушете, не се хранете или не използвайте козметика в зоните, в които се работи с мостри и реактивни разтвори.
20. Други отпадъчни материали генерирани от употребата на комплекта (например: остриета, използвани за проверки и мостри, използвани микроплички) трябва да бъдат считани за потенциално инфектирани и изхвърляни съгласно националните директиви и законите относно изхвърляне на отпадъци от лаборатории.
21. Не използвайте уста за да боравите с капкомера.

G. МОСТРИ: ПРИГОТВЯНЕ И ПРЕПОРЪКИ

1. Кръвта се взема асептично за венозно взимане и плазмите или серумите за приготвени, използвайки стандартните техники за приготвяне на мострите за клинични анализи в лаборатория. Никакво влияние не е наблюдавано при приготвянето на мострата с цитрат, EDTA или хепарин.

2. Избягвайте всякакво добавяне на консерванти към мострите; особено натриев азид, който може да повлияе на ензиматичната дейност на конюгата, генерирайки резултати с фалшиви негативи.
3. Мострите трябва да бъдат ясно идентифицирани с кодове или имена, за да се избегне объркване при интерпретацията на резултатите. Когато комплектът е използван за скрининг на кръвна проба, силно се препоръчва да се поставят етикети с баркодове и да се разчитат електронно.
4. Хемолизиран мостри (червени) и видимо хиперлипемични (млекоподобни) трябва да бъдат изхвърлени, защото могат да генерират фалшиви резултати. Мострите, съдържащи остатъци от фибрин или големи частици или влакна и микробиологични тела, трябва да бъдат изхвърлени, тъй като могат да породят фалшиви резултати.
5. Серуми и плазми, могат да бъдат съхранявани на +2...8°C до пет работни дни след взимане на кръв. За по-дълго съхранение, мострите могат да бъдат замразени на -20°C за няколко месеца. Всяка замразена мостра не може да бъде замразена и размразена повече от един път, тъй като това генерира частици, които могат да повлияят на резултата от теста.
6. Ако са налични частици, центрифугирани на 2.000 грт за 20 минути или филтрирани с филтри на 0.2-0.8µm за да се почисти тампона за тестване.

H. ПОДГОТОВКА НА КОМПОНЕНТИТЕ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Изследванията, извършени върху един отворен комплект и не са показали никаква значителна загуба на действие до 1 повторна употреба на същия материал в разстояние от 6 месеца.

1. Микро пличи:

Микропличката трябва да достигне температурата на помещението (поне 1h) преди да отворите плика. Проверете дали десиканта не е станал тъмно зелен, показвайки дефект на съхранение. В този случай се свържете с отдел обслужване на клиенти Adaltis. Лентите, които не са използвани, трябва да бъдат поставени в специалното пликче, при наличие на доставен десикант, плътно запечатани и съхранявани на 2...8°C. След първото отваряне, останалите ленти са стабилни, до когато индикаторът за влажност, наличен в плика на десиканта се промени от жълто до зелено.

2. Отрицателна контрола:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

3. Положителна контрола:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Третирайте този компонент, като потенциално инфектиран.

4. Калибратор:

Разтворете внимателно разтворимото съдържание на епруветката с обем вода от степен E1A, представено върху етикета. Смесване на vortex преди употреба.

Третирайте този компонент като потенциално инфектиран.

Забележка: След разтваряне калибраторът не е стабилен. Съхранявайте на равни части на -20°C.

5. Концентриран разтвор за измиване 20x: (флакон от 50 mL):

Цялото съдържание на разтвора, концентриран 20x трябва да бъде разтворен с двойно дестилирана вода, 1000 mL (обема е представен на етикета) и смесен внимателно преди употреба. В момента, в който в разтвора се наблюдава образуване на кристали, обърнете внимание да разтворите цялото съдържание. При приготвяне, като цяло избягвайте пяната, тъй като наличието на мехури може да намали ефикасността на измиването.

Забележка: След разреждане, разтворът за измиване е стабилен за 1 седмица на +2..8°C.

6. Конюгат:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Бъдете внимателни, за да не замърсите течността с химични оксиданти, прахове или микроби, налични във въздуха. Ако този компонент трябва да бъде прехвърлен, използвайте само пластмасови контейнери, по възможност стерилни.

7. Субстрат ТМВ:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба. Бъдете внимателни, за да не замърсите течността с химични оксиданти, прахове или микроби, налични във въздуха. Не излагайте на силно осветление, оксидиращи агенти и метални повърхности. Ако този компонент трябва да бъде прехвърлен, използвайте само пластмасови контейнери, по възможност стерилни.

8. Разтворител на Анализа:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

9. Блокиращ Разтвор:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

10. Разтворител на Мострата:

Готов за употреба. Смесване на vortex преди употреба.

I. ИНСТРУМЕНТИ ИЗПОЛЗВАНИ В КОМБИНАЦИЯ С КОМПЛЕКТА

1. Микро-капкомерите трябва да бъдат калибрирани за да отпускат правилния обем, изискан от анализа и трябва да бъдат подлагани на редовно обеззаразяване (денатуриран алкохол, белина 10%, болничен дезинфекциращ разтвор) на тези части, които могат да влязат случайно в контакт с мострата. Те трябва да бъдат поддържани под контрол за да се покаже една неточност от 1% и една точност от $\pm 2\%$. Обеззаразяването на пръски или остатъци от компоненти на комплекта трябва да бъде извършвано редовно.
2. Инкубаторът ELISA трябва да бъде калибриран на 37°C (отклонение от $\pm 0.5^\circ\text{C}$) и редовно проверяван, за да се подсигури поддържането на правилната температура. И двата инкубатора сух и с вода могат да бъдат използвани за инкубации, ако инструментите са конвалидирани за инкубация на тестове ELISA.
3. Устройството за измиване ELISA е особено важно за цялостната успеваемост на анализа. Устройството за измиване трябва да бъде валидирано внимателно и правилно оптимизирано. Обикновено, са достатъчни 4-5 цикъла на измиване (аспирация + разпределяне на 350 μL разтвор за измиване = 1 цикъл) за да се гарантира, че анализът ще даде очаквания

резултат. Препоръчва се един интервал на потапяне от 20-30 секунди между циклите. За да се определи правилно техният брой, се препоръчва да се извърши един пробен тест с проверки на комплекта и контролни мостри, добре характеризирани, като положителни или отрицателни и проверете съответствието на стойностите, посочени по-долу в раздел О "Проверка на вътрешното качество". Редовното калибриране на подадения обем и поддръжката на устройството за измиване (обеззаразяване и почистването на иглите) трябва да бъде извършено според инструкциите на производителя.

4. Сроковете на инкубация имат толеранс от $\pm 5\%$.
 - ✓ Метод на Кратка Инкубация (за 1^a/2^a инкубация толерантността е в рамките между 43 мин. и 47 мин.; за 3^a инкубация толерантността е в рамките между 14 и 16 мин.).
 - ✓ Метод на Стандартна Инкубация (за 1^a инкубация толерантността е в рамките между 57 мин. и 63 мин.; за 2^a и 3^a инкубация толерантността е в рамките между 29 и 31 мин.).
5. Четецът на микроплати ELISA трябва да бъде оборудван с филтър на разчитане 450nm и по-добре с един втори филтър (620-630nm) за операциите на празна клетка. Неговите стандартни характеристики трябва да бъдат (a) ширина на лента $\leq 10\text{nm}$; (b) интервал на абсорбция от 0 до ≥ 2.0 ; (c) линейност ≥ 2.0 ; (d) повтаряемост $\geq 1\%$. Празните клетки са определени според инструкциите, представени в раздел "Процедура на Анализа". Оптичната система на четеца трябва да бъде калибрирана редовно, за да се гарантира правилното измерване на оптичната плътност. Поддръжката трябва да бъде извършвана редовно според инструкциите на производителя.
6. Когато се използва една автоматизирана станция за работа за комплекта ELISA, всички критични стъпки (разпределяне, инкубация, измиване, разчитане, манипулация на данните) трябва да бъдат внимателно проверени, калибрирани и редовно поддръжани, за да се запази съответствието със стойностите, представени в разделите О "Проверка на вътрешното качество". Протоколът на анализа трябва да бъде инсталиран в оперативната система на устройството и заверено като за устройство за миене и четец. Освен това, частта от станцията, която работи с течните компоненти (разпределяне и измиване) трябва да бъде валидирана и правилно настроена. Особено внимание трябва да се обърне за да се избегне повличането от страна на иглите, използване за разпределяне и измиване. Това трябва да бъде разработено и контролирано, за да се сведе до минимум възможността от заразяване на близките клетки. Употребата на автоматизирани работни станции ELISA се препоръчва за скрининг на кръвта, когато броят на мостри, които да бъдат тествани, е по-голям от 20-30 за хода на машината.

L. ПРОВЕРКИ И ОПЕРАЦИИ ПРЕДИ АНАЛИЗ

1. Проверете датата на срока на годност на комплекта, отпечатана върху етикета от външната страна на кутията. Не използвайте комплекта, ако е с изтекъл срок.
2. Проверете дали течните компоненти не са замърсени от частици или агрегати, видими с човешко око. Проверете дали Субстратът ТМВ е безцветен или бледо синьо, като засмуквате малка част от същия, с един стерилен, пластмасов, прозрачен капкомер. Проверете дали не е настъпило никакво счупване на опаковката по време на транспорта и не е налично изтичане на

течности във вътрешността на кутията. Проверете дали алуминиевият плик, съдържащ микроплочата, не е пробит или повреден.

3. Разтворете цялото съдържание на разтвора за Измиване, концентриран 20x, както е описано по-горе.
4. Разтворете калибратора, както е описано по-горе.
5. Позволете на всички компоненти на комплекта да достигнат температурата на помещението (около 1h) и след това смесете, както е описано.
6. Настройте инкубатора ELISA на +37°C и подгответе устройството за измиване ELISA като го намокрпите с разределения разтвор за измиване, според инструкции на производителя. Задайте правилния брой цикъла на измиване, според представеното в раздел, както е описано в раздел I.3.
7. Проверете дали четецът ELISA е включен от поне 20 минути преди разчитането.
8. Ако се използва една автоматизирана работна станция, включете я, проверете настройките и се уверете, че използвате правилния протокол.
9. Проверете дали микро-капкомерите са настроени на дадения обем.
10. Проверете дали всички инструменти са налични и готови за употреба.
11. В случай на проблеми, не продължавайте с теста и информирайте отговорника.

М. ПРОЦЕДУРА НА АНАЛИЗ

Анализът трябва да бъде извършен съгласно представеното в последствие, като се обърне внимание да се запази същата инкубация за всички мостри за тестване.

Анализът може да бъде извършен посредством две процедури на инкубация. Изберете най-подходящата за вашия регламент:

1. Стандартна инкубация (1^a инкубация 60 минути, 2^a и 3^a инкубация 30 минути)
2. Кратка инкубация (1^a и 2^a инкубация 45 минути, 3^a инкубация 15 минути)

1. Инкубация Стандартна - Ръчен Анализ:

1. Въведете правилния брой микро шахти в специалната подпора. Оставете първата клетка празна за операциите с празна клетка.
2. Разпределете 200 µL от Отрицателна Проверка тройно, 200 µL от Калибратор двойно и 200 µL от Положителна Проверка единично в подходящите клетки. Не разреждайте Проверки и Калибратор тъй като вече предварително разреждени и готови за употреба!
3. Добавете 200 µL Разтворител на Мостри на всички клетки на мостри; след това разпределете 10 µL мостра във всяка клетка предварително идентифицирана. Раздвижете внимателно плочата, като избягвате препълвания и замърсяване на близките клетки, за да разтворите напълно мострата в нейния разтворител.

Важна забележка: Проверете дали цветът на Разреждителя на Мострата, след добавянето на мострата, варира от светло зелено до тъмно синьо-зелено, посочвайки, че мострата е била добавена.

4. Разпределете 50 µL от Разтворител за Анализ във всичките клетки за проверка/калибратор и на мострите. Проверете дали цветът на мострите се променя към тъмно син.
5. Изолирайте микроплочата за **60 мин. на +37°C**.
Важна забележка: Лентите трябва да бъдат покрити със специалния предоставен залепващ

лист, само когато тестът е извършен ръчно. Не покривайте лентите, когато се използва един автоматизиран инструмент ELISA.

6. Измийте микроплочата с едно автоматично устройство за измиване, чрез освобождаване и аспирация на 350 µL/клетка от разтвора за измиване, разтворен както е представено в раздел I.3.
7. Поставете с капкомер 100 µL на Ензимния Конюгат във всичките клетки с изключение на празната и покрийте със залепващ лист. Проверете дали този компонент с червен цвят е бил сипан във всички клетки, с изключение на A1.

Важна забележка: Внимание да не ударите повърхността на вътрешната пластмаса на клетката с върха, пълен с Конюгат. Може да настъпи замърсяване.

8. Изолирайте микроплочата за **30 мин. на +37°C**.
9. Измийте клетките, както е представено в раздел I.3.
10. Поставете с капкомер 100 µL от сместа на субстрата TMB във всяка клетка, също и в празната. Изолирайте микроплочата **на стайна температура (18-24°C) за 30 минути**.

Важна забележка: Не излагайте на силно директно осветление. Може да доведе до високи дъна.

11. Поставете с капкомер 100 µL от блокиращия разтвор във всяко кладенче, като използвате същата последователност на поставяне на капки, описана в точка 10 за да спрете ензимната реакция. Добавянето на Блокиращ Разтвор ще промени позитивната проверка и положителните мостри от синьо до жълто.
12. Измерете силата на цвета на разтвора във всяка клетка, както е описано в раздел 1.5, с един филтър за разчитане 450 nm и по възможност с един филтър 620-630 nm за операциите с празна клетка в позиция A1 на микроплоча.

Важни забележки:

1. Ако вторият филтър не е на разположение, уверете се, че не са налични дигитални отпечатъци на дъното на микроплочата, преди разчитането на 450nm. Подобни отпечатъци биха могли да генерират фалшиви положителни резултати.
2. Разчитането трябва да бъде извършено веднага след добавянето на Блокиращия Разтвор и при всички случаи, никога по-късно от 20 минути след това добавяне. Може да настъпи една лека самоокисидация на субстрата и да доведе до резултат на високо дъно.
3. Разбъркването на 350 ± 150 грт по време на инкубация е показало, че чувствителността на дозиране се увеличава с около 20%.

2. Инкубация Кратка - Ръчен Анализ:

1. Въведете правилния брой микро шахти в специалната подпора. Оставете първата клетка празна за операциите с празна клетка.
2. Разпределете 200 µL от Отрицателна Проверка тройно, 200 µL от Калибратор двойно и 200 µL от Положителна Проверка единично в подходящите клетки. Не разреждайте Проверки и Калибратор тъй като вече предварително разреждени и готови за употреба!
3. Добавете 200 µL Разтворител на Мостри на всички клетки на мостри; след това разпределете 10 µL мостра във всяка клетка предварително идентифицирана. Раздвижете внимателно плочата, като избягвате препълвания и

замърсяване на близките клетки, за да разтворите напълно мострата в нейния разтворител.

Важна забележка: Проверете дали цветът на Разредителя на Мострата, след добавянето на мострата, варира от светло зелено до тъмно синьо-зелено, посочвайки, че мострата е била добавена.

- Разпределете 50 µL от Разтворител за Анализ във всичките клетки за проверка/калибратор и на мострите. Проверете дали цветът на мострите преминава в тъмно син.
- Изолирайте микроплочата за **45 мин. на +37°C**.
Важна забележка: Лентите трябва да бъдат покрити със специалния предоставен залепващ лист, само когато тестът е извършен ръчно. Не покривайте лентите, когато се използва един автоматизиран инструмент ELISA.
- Измийте микроплочата с едно автоматично устройство за измиване, чрез освобождаване и аспирация на 350 µL/клетка от разтвора за измиване, разтворен както е представено в раздел I.3.
- Поставете с капкомер 100 µL на Ензимния Конюгат във всичките клетки с изключение на празната и покрийте със залепващ лист. Проверете дали този компонент с червен цвят е бил сипан във всички клетки, с изключение на A1.

Важна забележка: Внимание да не ударите повърхността на вътрешната пластмаса на клетката с върха, пълен с конюгат. Може да настъпи замърсяване.

- Поставете в инкубация за **45 мин. на +37°C**.
- Измийте клетките, както е представено в раздел I.3.
- Поставете с капкомер 100 µL от сместа на субстрата TMB във всяка клетка, също и в празната. Изолирайте микроплочата на температури на помещението (18-24°C) за **15 минути**.

Важна забележка: Не излагайте на силна директна светлина. Може да бъде генериран висок фон.

- Поставете с капкомер 100 µL от блокиращия разтвор във всяко кладенче, като използвате същата последователност на поставяне на капки, описана в точка 10 за да спрете ензимната реакция. Добавянето на Блокиращ Разтвор ще промени позитивните проверки и положителните мостри от синьо до жълто.
- Измерете силата на цвета на разтвора във всяка клетка, както е описано в раздел 1.5, с един филтър за разчитане 450 nm и по възможност с един филтър 620-630 nm за операциите с празна клетка в позиция A1 на микроплоча.

Важни забележки:

- Ако вторият филтър не е на разположение, уверете се, че не са налични дигитални отпечатъци на дъното на микроплочата, преди разчитането на 450nm. Подобни отпечатъци биха могли да генерират фалшиви положителни резултати.
- Разчитането трябва да бъде извършено веднага след добавянето на Блокиращия Разтвор и при всички случаи, никога по-късно от 20 минути след това добавяне. Може да настъпи лека самоокисидация на субстрата и да доведе до резултат на високо дъно.
- Разбъркването на 350 ± 150 грт по време на инкубация е показало, че чувствителността на дозиране се увеличава с около 20%.

N. СХЕМА НА АНАЛИЗ

Метод	Операции (Инкубация Стандартна)	Операции (Инкубация Кратка)
Проверки и Калибратор	200 µL	200 µL
Разтворител Мостри и Мостра	200 µL разтворител+ 10 µL мостра	200 µL разтворител+ 10 µL мостра
Разтворител за Анализ	50 µL	50 µL
1-ва инкубация	60 мин. (± 3)	45 мин. (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Измиване	4-5 цикъла	4-5 цикъла
Ензимен Конюгат	100 µL	100 µL
2-ра инкубация	30 мин. (± 1)	45 мин. (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Измиване	4-5 цикъла	4-5 цикъла
Субстрат TMB	100 µL	100 µL
3-та инкубация	30 мин. (± 1)	15 мин. (± 1)
Температура	Температура на помещението (18...24°C)	Температура на помещението (18...24°C)
Блокиращ	100 µL	100 µL
Разчитане OD	450/620nm	450/620nm

Един пример на схема на разпределяне е представен по-долу (валиден за двете процедури на инкубация):

Микроплоча

	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 = Бял NC = Отрицателна Проверка CAL = Калибратор PC = Положителна Проверка S = Мостра

O. ВЪТРЕШЕН КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

Една проверка на валидация се извършва на проверките и калибратора, всеки път, когато се използва комплекта, за да се провери дали характеристиките на анализа съответстват на стойностите на OD450/620nm както и на очакваните стойности и представени в следната таблица:

Проверка	Изисквания
Бял	< 0.100 OD 450/620nm стойност
Отрицателна Проверка (NC)	< 0.050 средна стойност OD450/620nm след насищане на празната клетка
Калибратор	S/Co >1.1
Позитивен Контрол	>1.000 OD450/620nm стойност

Ако резултатите от теста отговарят на изискванията, определени по-горе, пристъпете към следващия избор. Ако не отговарят, не продължавайте и извършете следните проверки:

Проблеми	Проверка
Бял > 0.100 OD450nm	1. че разтворът на субстрата, не е замърсен по време на анализа
Отрицателна Проверка (NC) > 0.050 OD450nm след изваждане на празната клетка	1. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 2. че е използван правилния разтвор за измиване и че устройството за измиване е било повредено преди употреба; 3. е не е допусната нито една грешка при процедурата на анализа (разпределяне на положителната проверка, вместо на отрицателната); 4. че не е настъпило никакво замърсяване на отрицателната проверка или на неговите клетки поради пръски на положителни мостри или на ензимен конюгат; 5. микро-капкомерите не са замърсени с положителни мостри или ензимен конюгат; 6. дали иглите на устройството за измиване не са блокирани или частично запушени.
Калибратор S/Co < 1.1	1. че процедурите са извършени правилно; 2. че не е допусната нито една грешка при дистрибуция (пр. дистрибуция на отрицателен контрол вместо на калибратор); 3. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 4. че не е настъпило никакво външно замърсяване на калибратора.
Позитивен Контрол <1.000 OD450nm	1. че процедурите са извършени правилно; 2. че не е допусната нито една грешка при дистрибуция на проверката (дистрибуция на отрицателен контрол вместо положителен). В този случай, отрицателната проверка ще покаже един OD450nm > 0.150 3. че процедурата и настройките на устройството за измиване са валидирани според изследванията на преквалификация; 4. че не е настъпило никакво външно замърсяване на положителната проверка

Ако е настъпил някой от проблемите, представени по-горе, информирайте отговорника за допълнителни действия.

Р. РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от теста са изчислени върху средната стойност на cut-off, определена със следната формула:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC среден} + 0.350$$

Намерената стойност за теста е използвана за резултатите, както е описано в следващия параграф.

Q. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Резултатите от теста са тълкувани, като съотношение между OD450nm на мострата и стойността Cut-Off (или S/Co) според следната таблица:

S/Co	Интерпретация
< 0.9	Отрицателно
0.9 - 1.1	Грешен
> 1.1	Позитивен

Един отрицателен резултат показва, че пациентът не е заразен от HCV или че кръвната проба може да бъде прелята.

Тези пациенти, които показват грешен резултат, трябва да бъдат тествани повторно, с една мостра, взета 1-2 седмици по-късно. Кръвната проба не трябва да бъде преливана.

Един положителен резултат показва наличието на инфекцията от HCV, следователно пациентът трябва в последствие да бъде лекуван и кръвната проба трябва да бъде отхвърлена.

Важни забележки:

- Интерпретацията на резултатите трябва да бъде извършена под наблюдението на отговорника на лабораторията, за да се намали риска от грешки при преценката.
- Всеки позитивен резултат трябва да бъде потвърден от един алтернативен метод, в състояние да открие антителата IgG и IgM (тест за потвърждение) преди да се даде една диагноза на вирусен хепатит.
- Както е показано в оценката на характеристиките на продукта, анализът е в състояние да отчете сероконверсията за антитела анти-HCV ядро, преди някои други комплекти от търговската мрежа. Следователно един положителен резултат, не потвърден, с тези търговски комплекти, не трябва да бъде изключен, като резултат фалшиво положителен! Мострата трябва да бъде при всички случаи да бъде подложен на един потвърдителен тест.
- В момента, в който анализът е в състояние да определи също така антитела от клас IgM, могат да бъдат открити различия с други търговски продукти за определянето на антитела анти HCV липси на конюгат анти IgM. Реалната положителност на мострата за антителата HCV трябва да бъде в последствие потвърдена, изследвайки също така реактивността IgM, важна за диагнозата на инфекцията HCV.
- Когато резултатите са предадени от една лаборатория на един информационен център, бъдете внимателно, за да не прехвърлите грешни данни.
- Диагнозата не трябва да бъде направена и съобщена на пациента, единствено от квалифициран медицински персонал.

Един пример на изчисление е представен в последствие:

Следните данни не трябва да бъдат използвани на мястото на реалните данни, използвани от потребителя.

Отрицателна Проверка: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Средна стойност: 0.020 OD450nm По-малко от 0.050 – Приет

Положителна Проверка: 2 189 OD450nm По-висок от 1.000 – Приет

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370
 Калибратор: 0.550 - 0.530 OD450nm
 Средна стойност: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4
 S/Co по-висок от 1.1 – Прием

Мостра 1: 0 070 OD450nm
 Мостра 2: 1 690 OD450nm
 Мостра 1 S/Co < 0.9 = отрицателен
 Мостра 2 S/Co > 1.1 = положителен

R. ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оценката на Характеристиките е проведена в съответствие с представеното в Common Technical Specifications или CTS (чл. 5, Раздел 3 на IVD Директива 98/79/ЕС) и на двете процедури на инкубация (стандартна и кратка).

1. ГРАНИЦА НА ОТЧИТАНЕ

Границата на отчитане на анализа е изчислена, използвайки процедурата на кратка инкубация посредством British Working Standard за анти-HCV, NIBSC код 06/188-006. Следващата таблица представя следните стойности OD450nm на стандартната, разрежена в отрицателна плазма и след това изследвана.

Разреждане	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Фактор	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
Отрицателна Плазма	0,25	0,20	0,20

Освен мострата с код Accurun 1 - серия 3000 – доставен от Boston Biomedica Inc., USA, е оценен "изцяло" показвайки следните резултати:

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

2. ДИАГНОСТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЧУВСТВИТЕЛНОСТ

Оценката на Характеристиките на устройството е извършена от един тест, проведен върху повече от 5000 мостри.

2.1 Диагностична Характеристика

Определена е като вероятност на анализа да бъде негативен, при липса на специфичен анализ. Изследвани са общо повече от 5000 случайни донори, включително даряващи за първи път. Диагностичната характеристика е била гарантирана срещу един одобрен комплект US FDA. 5043 дарители са били тествани, давайки една спецификация от 99.5%. 210 пациенти приети в болница, са били тествани за HCV; открита е диагностична специфичност 99.5%. Освен това, диагностичната характеристика е била доказана, тествайки 162 мостри, потенциално намесени (други заразни болести, положителни антитела E.coli, пациенти, страдащи от не вирусни чернодробни заболявания, пациенти на диализа, бременни жени, хемолизиран, липемични, и др.). Доказана е една стойност на специфичност 100%.

Не е наблюдавана никаква фалшива реактивност, дължаща се на метода на приготвяне на мострите. Както плазми, произхождащи от различните стандартни техники на подготовка (цитрат, EDTA и хепарин) и серумите, са били използвани за да се определят стойностите на специфичност. Тествани са замразените мостри, за да се проверят намесите, дължащи се на събирането и консервирането. Не е наблюдавано никакво взаимодействие.

2.2 Диагностична Чувствителност

Определена е като вероятност на анализа да бъде положителен, при липса на специфичен анализ. Диагностичната чувствителност е била потвърдена външно, върху един общ брой от 348 мостри; открита е една диагностична чувствителност от 100%. Вътрешно са били тествани повече от 50 положителни мостри, предоставяйки още една стойност на диагностична чувствителност 100%. Тествани са положителни мостри, от инфекции, провокирани от генотопи, различни от HCV.

Освен това са изследвани по-голямата част от панели за сероконверсия, доставени от Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) и Zeptomatrix, USA, (HCV).

Резултатите за някои от тях са представени в последствие.

Панел	№ мостри	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

Забележка:

1. Положителни Мостри
2. HCV v.3.0

Накрая, продуктът е бил тестван на панел EFS Ac HCV, партида n° 06.140817, доставен от Etablissement Francais Du Sang (EFS), Франция, със следните резултати:

Панел EFS Ac HCV

Мостра	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Резултати очаквани
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Отрицателно
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Позитивен
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Позитивен
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Позитивен
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Позитивен
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Позитивен

3. УТОЧНЕНИЕ

Изчислена е върху пет мостри, един отрицателен и четири положителни, изследвани в 4 повторения в четири отделни стартирания.

Резултатите са представени в последствие:

Резултати в рамките на партидата: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o Партида (кратка процедура на инкубация)

Мостра	S/Co Средна	Точност - %CV		
		Inter Анализ	Intra Анализ	Общо
Отрицателно	0.03	6.66	10.56	12.48
Положителни	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

Резултати в рамките на партидата: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o Партида (дълга процедура на инкубация)

Мостра	S/Co Средна	Точност - %CV		
		Inter Анализ	Intra Анализ	Общо
Отрицателно	0.04	4.67	12.34	13.19
Положителни	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

Резултати в партида: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -

1^o, 2^o и 3^o Партида (процедура кратка инкубация)

Мостра	Точност - %CV		
	Партида 1	Партида 2	Партида 3
Отрицателно	8,65	8,29	6,13
Калибратор	4,98	4,44	5,38
Позитивен	4,11	3,11	1,37

Променливостта, показана в таблиците, не е регистрирана в липса на класифициране на мострите.

S. ПРЕПОРЪКИ ЗА РЕШАВАНЕТО НА ПРОБЛЕМИ

Спазването на процедурата и на характеристиките, както и правилната употреба на реагентите и възможността на разпределянето, могат да предотвратят следните видове грешки:

ГРЕШКА	ВЪЗМОЖНИ ПРИЧИНИ / ПРЕПОРЪКИ
OD много различни (± 50%) от тези, представени в QC	<ul style="list-style-type: none"> - грешен обем за разпространяване на реагенти (препоръка: проверете съответствието между обема, зададен в капкомерите и този, изискван от анализа, калибрирайте отново) - грешна температура или грешно време на инкубация (препоръка: най-стриктна поддръжка на инкубатора, да се отбележи началото на инкубацията) - грешка при извършване на измиванията и на фотометричното разчитане (препоръка: проверете функционирането или настройките на съответните инструменти) - замърсяване на Субстрата или на Конюгата (препоръка: използвайте само чисти пластмасови съдове за еднократна употреба)
Резултати слабо възпроизводими	<ul style="list-style-type: none"> - непостоянен обем на разпределяне на реагентите и на мострите (препоръка: проверете точността на капкомерите и съответствието между разпределяния обем и изискания от анализа; калибрирайте повторно) - грешка при извършване на измиванията или на разчитането (препоръка: проверете функционирането или настройките на съответните инструменти) - замърсяване на Субстрата (препоръка: използвайте само чисти пластмасови съдове за еднократна употреба) - замърсяване или деградация на реагентите (препоръка: използвайте подходящи игли, чисти пластмасови съдове за еднократна употреба и дестилирана вода или еквивалент)
Няма реакция в промяна на цвета след добавяне на Субстрата	<ul style="list-style-type: none"> - някои реагенти не са били разпространени - силно замърсяване на Конюгата или на Субстрата - грешно изпълнение на процедурата на анализа (пр. случайно разпределение на реагентите в една грешна последователност или от грешния съд, и др.)
Реакция прекалено разводнена (OD прекалено ниски)	<ul style="list-style-type: none"> - прекалено кратко време на инкубация, прекалено ниска температура на инкубация - грешно разреждане на конюгата
Реакция прекалено силна (OD прекалено високи)	<ul style="list-style-type: none"> - грешно разреждане на конюгата - време на инкубация прекалено дълго, температура на инкубация прекалено висока - лошо качество на използваната вода за разтвор за измиване (ниска степен на дейонизация) - недостатъчно измиване (конюгатите не са правилно отстранени)
Необясними резултати	<ul style="list-style-type: none"> - замърсяване на капкомерите, на върховете или на контейнерите - непрекъснато и недостатъчно измиване (конюгатите не са правилно отстранени)
CV% вътрешен анализ висок	<ul style="list-style-type: none"> - реагенти и/или не достигнали до температури на помещението преди употреба - устройството за измиване за микроплови не измива правилно (препоръка: почистете главата на устройството за измиване)
CV% интра-анализ висок	<ul style="list-style-type: none"> - непостоянни условия на инкубация (време, температура) - проверки и мостри, които не са разпределени в едно и също време (с едни и същи интервали) (проверете последователността на разпространяване) - присъща променливост на операторите

T. АВТОМАТИЗАЦИЯ

Процедурата, описана в тази инструкция за употреба е само за ръчно тестване. Когато се използват автоматични анализатори, е необходимо да се следват инструкциите, които са описани в ръководствата за употреба на самото устройство. Всяка лаборатория трябва да следва своите процеси за вътрешна валидация, демонстрирайки съвместимостта с автоматичните системи.

U. ОГРАНИЧЕНИЯ

повтарящи се фалшиви положителни резултати, непотвърдени от RIBA за потвърждение или подобни техники, са били оценени с по-малко от 0,1% от нормалното население.

Замразените мостри, съдържащи частици от фибрин или агрегати след размразяването, са показали като цяло фалшиви резултати.

БИБЛИОГРАФИЯ

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Lea atentamente este manual ilustrado antes de utilizar el producto y siga detalladamente las instrucciones contenidas en el mismo.

La fiabilidad de los resultados está garantizada solamente si se siguen atentamente las instrucciones.



Fabricante:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

es

SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS

Español ES							
	Dispositivo Médico de Diagnóstico in Vitro	Número de Catálogo	Número de Lote	Atención, siga las Instrucciones de uso	Límites de Temperatura	Utilizar Antes de	Número de prueba
	Fabricante	Proteja de la Luz Solar	Fecha de Fabricación	Microplaca	Control Positivo	Control Negativo	Calibrador
	Conjugado	Diluyente Muestras	Substrato TMB	Solución Bloqueadora (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Tampón de Lavado Concentrado 20x	Diluyente del Ensayo	Reconstituir con x mL
	Riesgo Biológico	Peligro	Atención				

Atención:

Solución Bloqueadora clasificada como: Skin Corr. (Corrosivo para la Piel) 1A



- **Advertencia:**
Peligro
- **Componentes peligrosos que determinan el etiquetado:**
Ácido sulfúrico
- **Indicaciones de peligro:**
H314 Provoca graves quemaduras cutáneas y graves lesiones oculares.
- **Consejos de prudencia:**
P260 No respire el polvo/los humos/los gases/las nieblas/los vapores/ los aerosoles.
P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o con el pelo): quítese inmediatamente toda la vestimenta contaminada. Enjuague la piel/dúchese.
P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuague con agua delicadamente durante unos minutos. Quítese los lentes de contacto si es capaz de hacerlo. Continúe enjuagándose.
P310 Póngase en contacto inmediatamente con un CENTRO ANTIVENENOS o con un médico.
P405 Conserve bajo llave.
P501 Elimine el producto/recipiente en conformidad con los reglamentos locales/regionales/nacionales/internacionales

Atención:

Control Negativo, Control Positivo, Calibrador, Conjugado, Diluyente Muestras, Diluyente del Ensayo y Tampón de Lavado Concentrado 20X clasificados como: Skin Sens. (Sens. para la Piel) 1



- **Advertencia:**
Atención
- **Componentes peligrosos que determinan el etiquetado:**
Mezcla de: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC nº 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC nº 220-239-6] (3:1)
- **Indicaciones de peligro:**
H317 Puede provocar una reacción alérgica cutánea
- **Consejos de prudencia:**
P261 Evite respirar el polvo/los humos/los gases/las nieblas/los vapores/ los aerosoles.
P280 Utilice guantes/vestimenta de protección/Proteja los ojos/el rostro.
P321 Tratamiento específico (véase en esta etiqueta).
P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: consulte con un médico.
P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lave con abundante agua.
P501 Elimine el producto/recipiente en conformidad con los reglamentos locales/regionales/nacionales/internacionales

Para las Fichas de Seguridad visite www.adaltis.net.

A. FINALIDADES DE USO

Dosificación Inmunoenzimática (ELISA) de cuarta generación para determinar los anticuerpos anti Virus de la Hepatitis C en plasmas (EDTA, Heparina y Citrato) y sueros humanos. El conjunto puede utilizarse para investigar los anticuerpos en las unidades de sangre de pacientes afectados por HVC.

Sólo para uso diagnóstico in vitro.

B. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Sanidad (OMS) define a la infección Hepatitis C del modo siguiente:

“La Hepatitis C es una infección viral del hígado que se le atribuye a la hepatitis "ni A ni B" transmitidas de forma parental hasta identificar el agente causante en el 1989. El descubrimiento y la caracterización del virus de Hepatitis C (HCV) lleva a comprender su papel primario en las hepatitis pos-transfusión y su tendencia para inducir infecciones persistentes”.

El HCV es una causa importante de hepatitis aguda y enfermedad hepática crónica, incluida la cirrosis y el cáncer de hígado. A nivel mundial, se estima que 170 millones de personas están infectadas crónicamente con el VHC y de 3 a 4 millones de personas se infectan cada año. El HCV se transmite principalmente por contacto directo con sangre humana. Las mayores causas de HCV en el mundo son el uso de unidades de sangre no controlado para las transfusiones y la reutilización de agujas y jeringas no adecuadamente esterilizadas.

Actualmente no existe ninguna vacuna que prevenga la hepatitis C y el tratamiento de esta enfermedad crónica es demasiado costoso para que países en vías de desarrollo puedan permitírselo. Desde una perspectiva global, el más grande impacto en enfermos de hepatitis C se obtendrá enfocando los esfuerzos en reducir los riesgos de transmisión de HCV de exposiciones nosocomiales (transfusiones de sangre, inyecciones no seguras) y comportamientos de alto riesgo (inyección de drogas).

El virus de la hepatitis C (HCV) es uno de los virus (A, B, C, D, y E), responsables de la mayor parte de casos de hepatitis viral. Es un virus RNA que pertenece a la familia Flaviviridae que presenta un bajo espectro de huésped. Los humanos y los chimpancés son las especies susceptibles a infectarse y ambos desarrollan las mismas enfermedades. Una característica importante del virus es la correspondiente mutabilidad del genoma, que probablemente está relacionada con la alta tendencia (80%) en inducir infecciones crónicas. El HCV se encuentra en diferentes genotipos diferentes que pueden ser importantes para determinar la gravedad de la enfermedad y la respuesta al tratamiento.

El periodo de incubación de la infección por HCV antes que inician los síntomas clínicos va de 15 a 150 días. En las infecciones agudas los síntomas más comunes son la fatiga e ictericia; de todos modos la mayor parte de los casos (entre el 60% y el 70%) son asintomáticos, incluso aquellos que desarrollan la infección crónica. Alrededor del 80% de los nuevos pacientes infectados desarrolla una infección crónica. Cirrosis la desarrolla alrededor del 10% al 20% que tienen una infección crónica, mientras que cáncer de hígado lo manifiesta entre el 1% y el 5% de las personas que tienen una infección crónica durante un periodo de 20 a 30 años. La mayor parte de pacientes que padecen cáncer de hígado que no

presentan infección de hepatitis B muestran infección por HCV. El mecanismo por el que la infección por HCV conduce al cáncer de hígado aún no es muy claro. La hepatitis C agrava la gravedad de las enfermedades de hígado cuando coexiste con otras condiciones hepáticas. Las enfermedades del hígado avanzan más rápidamente en personas con enfermedades hepáticas provocadas por el abuso de alcohol e infectadas con HCV. El HCV se transmite principalmente por contacto directo con sangre infectado. La transmisión a través de transfusiones de sangre no examinada para el HVC, la reutilización de agujas, jeringas y otros equipos médicos no adecuadamente esterilizados, o a través del intercambio de agujas entre drogodependientes está muy bien documentada. Menos frecuente es la transmisión por vía sexual o perinatal. Otros modos de transmisión están relacionados con prácticas comportamentales, sociales, culturales (body piercing, circuncisiones y tatuajes) y pueden producirse si se utilizan instrumentos no esterilizados correctamente. El HCV no se transmite a través de estornudos, abrazos, tos, alimentos o agua, compartiendo cubiertos o vasos ni por contacto casual.

Sea en países desarrollados que en aquellos en vías de desarrollo, grupos con alto riesgo incluyendo a usuarios de drogas inyectables, receptores de sangre no examinada, hemofílicos, dializados y personas con numerosos compañeros sexuales que practican relaciones sin protección. En los países desarrollados se estima que el 90% de las personas con infección de HCV crónica sean principalmente usuarios de drogas inyectables y aquellos con un historial de transfusiones de sangre no examinada o de hemoderivados. En la mayor parte de los países en vías de desarrollo, donde la sangre y los hemoderivados no examinados son aún utilizados, el medio principal de transmisión de la infección son instrumentos para inyecciones no esterilizados y transfusiones de sangre no controlada. Además las personas que practican sacrificios y circuncisiones están a riesgo si usan o reutilizan hierros sin esterilizar.

La OMS estima que alrededor de 170 millones de personas, el 3% de la población mundial está infectada por HCV y corren riesgo de desarrollar cirrosis y/o cáncer de hígado. La mayor parte de la infección HCV en África, Oriente Medio, Sudeste asiático y Pacífico occidental es alta si se compara con Norteamérica y Europa.

Las pruebas que diagnostican el HCV se utilizan para prevenir la infección a través del control de los donantes de sangre y plasma, para establecer el diagnóstico clínico y tomar mejores decisiones a la hora de curar un paciente. Actualmente las pruebas de diagnóstico se basan en dosis inmunoenzimáticas (EIA) para detectar anticuerpos específicos HCV. El sistema EIA puede detectar más del 95% de pacientes infectados crónicos pero solamente del 50% al 70% de las infecciones agudas. Un ensayo inmunoblot recombinante (RIBA) que identifica a los anticuerpos que actúan con antígenos individuales HCV a menudo se utiliza como una prueba complementaria para confirmar el resultado EIA positivo. Prueba para HCV basadas en la ampliación del RNA (p.ej PCR, ensayo ADN relacionado) también se han utilizado sea para confirmar el resultado serológico que para asignar una terapia antiviral eficaz. Un resultado positivo indica la presencia de infección activa y la

posibilidad de difusión de la infección y/o el desarrollo de enfermedades crónicas del hígado.

Los fármacos antivirales como el interferón asumido solo o junto a ribavirina, puede utilizarse para tratar personas con hepatitis C crónica, pero el coste del tratamiento es muy alto. El tratamiento con interferón solo es eficaz en alrededor el 10%-20% de los pacientes. El interferón combinado con ribavirina es eficaz en el 30%-50% de los pacientes. La ribavirina parece que no es eficaz cuando es utilizada sola.

No existe ninguna vacuna eficaz contra el HCV. La investigación procede pero la alta mutabilidad del genoma del HCV complica el desarrollo de una vacuna. La falta de conocimiento de respuestas inmuno-protectoras después de la infección por HCV impide investigar una vacuna. Tampoco se sabe si el sistema inmunitario es capaz de eliminar el virus.

Algunos estudios han mostrado la presencia de anticuerpos que neutralizan el virus en pacientes afectados por HCV. Al no existir una vacuna, se deben tomar todas las precauciones para prevenir la infección incluidas (a) screening y pruebas de sangre y órganos; (b) desactivación del virus en plasmas y productos derivados; (c) crecimiento y mantenimiento de prácticas de control de la infección en protocolos de atención sanitaria, como la esterilización adecuada de instrumentos médicos y dentales; (d) la promoción de cambios en los comportamientos entre la gente común y los operadores sanitarios para reducir el uso excesivo de inyecciones y practicar inyecciones seguras; (e) la reducción del riesgo para personas que usan drogas y realizan prácticas sexuales de alto riesgo.

El genoma codifica para los componentes estructurales, una proteína nucleocapsídica y glicoproteínas del envoltorio, y los constituyentes funcionales implicados en la replicación del virus y en el proceso de sus proteínas. La región codificadora nucleocapsídica parece ser la más conservadora entre los aislantes obtenidos en el mundo.

C. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Las microplacas se coaptan con antígenos HCV-específicos que derivan de las regiones "core" y "ns" codificadores para los antígenos inmunodominantes conservativos y determinantes (Core péptide, recombinante NS3, NS4 y NS5 péptidos).

Primero la fase sólida se trata con la muestra diluida y los anticuerpos HCV, si están presentes, son capturados por los antígenos. Después de haber lavado todos los componentes de la muestra, durante la segunda incubación legados los anticuerpos HCV, las IgG y las IgM se detectan al añadir anticuerpos policlonales específicos anti IgG&M, etiquetados con peroxidasa (HRP).

La enzima capturada durante la fase sólida, al reaccionar con la mezcla substrato TMB, genera una señal óptica que es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti HCV presentes en la muestra. Un valor de cut-off permite interpretar las densidades ópticas en resultados positivos y negativos en anticuerpos HCV.

D. COMPONENTES

El kit contiene reagentes para 96 tests (código 071067), 192 tests (código 071064), o 480 tests (código 071068).

Microplaca	1
Control Negativo	1x4 mL/frasco
Control Positivo	1x2 mL/frasco
Calibrador	2 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	1x50 mL/frasco
Conjugado	1x16 mL/frasco
Diluyente de las Muestras	1x50 mL/frasco
Substrato TMB	1x16 mL/frasco
Solución Bloqueadora	1x15 mL/frasco
Diluyente del Ensayo	1x8 mL/frasco
Hoja cubreplaca	2
Número de los tests	96
Código	071067

Microplaca	2
Control Negativo	2x4 mL/frascos
Control Positivo	1x4 mL/frasco
Calibrador	3 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	2x50 mL/frascos
Conjugado	2x16 mL/frascos
Diluyente de las Muestras	2x50 mL/frascos
Substrato TMB	2x16 mL/frascos
Solución Bloqueadora	2x15 mL/frascos
Diluyente del Ensayo	2x8 mL/frascos
Hoja cubreplaca	4
Número de los tests	192
Código	071064

Microplaca	5
Control Negativo	1x20 mL/frasco
Control Positivo	1x10 mL/frasco
Calibrador	7 frascos
Solución de Lavado conc. 20x	5x50 mL/frascos
Conjugado	2x40 mL/frascos
Diluyente de las Muestras	5x50 mL/frascos
Substrato TMB	2x40 mL/frascos
Solución Bloqueadora	2x40 mL/frascos
Diluyente del Ensayo	1x40 mL/frasco
Hoja cubreplaca	10
Número de los tests	480
Código	071068

1. Microplaca

12 tiras de 8 microceldas coaptadas con Core péptide, recombinante NS3, NS4 y NS5 péptidos. Las placas se sellan en una bolsa de aluminio con desecante. Lleve la microplaca a temperatura ambiente (18...24°C) antes de abrir la bolsa. Vuelva a sellar las tiras que no se han utilizado en la bolsa con el desecante y conserve a 2...8°C.

2. Control Negativo

Control listo para usar. Contiene tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1, 2% de caseína y 0.1% Proclin 150 como conservante. El control negativo está codificado con el color verde aceituna.

3. Control Positivo

Control listo para usar. Contiene el 1% de proteínas de suero de cabra, anticuerpos humanos positivos al HCV, tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Azida de sodio y 0.1% Proclin 150 como conservantes. El control positivo está codificado con el color verde oscuro.

Nota Importante: La ausencia de agentes patógenos vitales en el Control Positivo no puede estar completamente garantizada, y por lo tanto, el reagente tiene que ser tratado como potencialmente infectado, en conformidad con las buenas prácticas de laboratorio.

4. Calibrador

Calibrador liofilizado. Tiene que disolverse con un volumen de agua grado EIA que se muestra sobre la etiqueta. Contiene proteínas de suero bovino fetal, anticuerpos al HCV humanos cuyo contenido está calibrado en NIBSC Working Standard código 06/188-006, 10mM de tampón Citrato de sodio a pH 6.0±0.1, 0.3 mg/mL de gentamicina sulfato y 0.1% de Proclin 150 como conservantes.

Nota Importante: La ausencia de agentes patógenos vitales en el Calibrador no puede estar completamente garantizada, y por lo tanto, el reagente tiene que ser tratado como potencialmente infectado, en conformidad con las buenas prácticas de laboratorio.

Notas: el volumen necesario para diluir el contenido de la ampolla puede variar de lote en lote. Por favor, utilice el volumen correcto que se muestra en la etiqueta.

5. Solución de Lavado Concentrada 20x

Solución concentrada 20X. Una vez diluida, la solución de lavado (tampón de lavado diluido) contiene tampón fosfato 10 mM a pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 y 0.05% Proclin 150.

Una vez diluida la solución de lavado permanece estable durante 1 semana a 2...8°C.

6. Conjugado

Reagente listo para usar y codificado de color rojo. Contiene peroxidasa de rábano conjugada con anticuerpos policlonales de cabra a IgG y IgM humanas, 5% BSA, tampón Citrato 10 mM a pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Proclin e 0.05% Tween 20 como conservantes.

7. Substrato TMB

Componente listo para usar. Contiene tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido al 4%, 0.03% de tetrametilbenzidina (TMB) y 0.02% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Mezcle bien antes de usar.

Nota: Debe conservarse en un lugar protegido de la luz solar debido a la sensibilidad a la fuerte iluminación.

8. Diluyente del Ensayo

Componente listo para usar. Contiene suero de cabra, solución tamponada de Tris 10mM a pH 8.0±0.1 que contiene 0.1% de Proclin 150 y 0.09% Azida de sodio para el pretratamiento de las muestras y de los controles en la placa, bloqueando las interferencias.

9. Solución Bloqueadora

Componente listo para usar. Contiene una solución 0.3 M de H₂SO₄. Mezcle bien antes de usar.

10. Diluyente Muestra

Componente listo para usar y codificado de color verde oscuro. Contiene 1% de caseína, tampón Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1 y 0.1% Proclin 150 como conservante.

Utilice para diluir la muestra.

Nota: El diluyente cambia color de verde aceituna a verde azul oscuro en presencia de la muestra.

E. MATERIALES SOLICITADOS PERO NO ENTREGADOS

1. Micropipetas calibradas (200 µL y 10 µL) y puntas desechables.
2. Agua grado EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón activo para eliminar los oxidantes químicos usados como desinfectantes).
3. Temporizador con intervalo de tiempo de 60 min o superior.
4. Hojas de papel absorbente.
5. Incubadora termostática calibrada para microplacas ELISA capaz de suministrar una temperatura de +37°C.
6. Lector calibrado de microceldas ELISA con lectura a 450nm posiblemente con filtros a 620-630nm para determinar el blanco.
7. Lavador calibrado de microplaca ELISA.
8. Vórtex o instrumentos similares para mezclar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El kit debe utilizarse solamente por personal técnico especializado y formado correctamente, bajo la supervisión del médico responsable del laboratorio. Lea atentamente este manual ilustrado antes de utilizar el producto y siga detalladamente las instrucciones contenidas en el mismo.
2. Lea atentamente la Ficha de Seguridad (SDS) antes de utilizar.
3. Cuando el kit se utiliza para el screening de unidades de sangre y componentes de la sangre, se tiene que utilizar en un laboratorio certificado y cualificado por la autoridad nacional en ese campo (Ministerio de la Sanidad o similares) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal implicado en la realización del ensayo tiene que utilizar vestimenta de protección de laboratorio, guantes de látex sin talco y gafas. Se tiene que evitar el uso de dispositivos apuntados (agujas) o cortante (hojas). Todo el personal implicado debería estar formado acerca de los procedimientos de seguridad personal, tal y como está recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (EE.UU) y publicado en la publicación del Instituto Nacional de Sanidad: "Seguridad personal en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", ed. 1984.
5. Todo el personal implicado en manipular las muestras debería vacunarse para HBV y HAV, por lo que las vacunas disponibles son seguras y eficaces.
6. El ambiente de laboratorio debería estar controlado para evitar la contaminación de polvo y agentes microbiológicos en el aire, cuando se abren las ampollas y la microplaca del kit y cuando se realiza el test. Proteja el cromógeno/substrato TMB de la luz fuerte y evite vibraciones de la mesa de laboratorio una vez que el test se haya iniciado.
7. Desde el momento de la recepción, conserve el kit a 2...8°C en un frigorífico o cámara fría a temperatura controlada.
8. No intercambie los componentes entre los diferentes lotes del kit, Se recomienda no intercambiar los componentes de dos kits del mismo lote.
9. Controle que los reagentes sean limpios y no contengan grandes partículas o agregaciones. Si esto se produce alerte al supervisor del laboratorio para iniciar los procedimientos necesarios para sustituir el kit.

10. Evite contaminaciones cruzadas entre muestras de sueros/plasmas utilizando puntas desechables y cambiándolas después de cada muestra.
11. Evite contaminaciones cruzadas entre los reagentes del kit utilizando puntas desechables y cambiándolas para usar cada componente.
12. No utilice el kit después de la fecha de caducidad que aparece imprimida en el envase externo y sobre la etiqueta de cada ampolla en el interior.
13. Trate todas las muestras como potencialmente infectadas. Todos los sueros humanos deberían ser manipulados según el Nivel 2 de BioSeguridad, tal y como está recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (EE.UU) junto con lo publicado por el Instituto de Sanidad: "BioSeguridad en los Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", ed. 1984.
14. El uso de contenedores de plástico desechables está recomendado para preparar componentes líquidos o para los componentes transferidos en ubicaciones automatizadas, para evitar contaminaciones cruzadas.
15. Los productos de desecho durante el uso del kit tiene que descargarse en conformidad con las directivas nacionales y las leyes sobre desechos de sustancias químicas y biológicas de laboratorio. En particular, los desechos líquidos generados del proceso de lavado, de avances de los controles y de las muestras deben tratarse como materiales potencialmente infectados e inactivados antes de ser eliminados. Se recomienda inactivar para el tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 10% unas 16-18 horas o desactivación en caliente en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
16. Los vuelcos accidentales de las muestras durante las operaciones deben absorberse con hojas de papel embebidas de hipoclorito de sodio y después enjuagados con agua. Después las hojas de papel deben eliminarse en un contenedor de desechos para materiales biológicos.
17. La Solución bloqueadora contiene ácido sulfúrico al 0.3 M. Evite el contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto enjuague inmediatamente y con abundante agua.
18. Las soluciones reagentes que contienen Azida de sodio o Tiomersal como conservantes, tienen que tratarse siguiendo las disposiciones y las leyes en vigor en el País en las que se usa. La eliminación de soluciones que contienen Azida de sodio tiene previsto el uso de agua corriente en grandes cantidades. Preste atención al hecho que la Azida de sodio puede formar compuestos explosivos en caso de contacto prolongado con plomo y cobre.
19. No fume, no coma o aplique cosméticos en las zonas donde se manipulan las muestras y los reagentes.
20. Otros materiales de desecho generados por el uso del kit (por ejemplo: las puntas utilizadas para controles y muestras, microplacas usadas) deberían ser manipulados como potencialmente infectados y depositados en conformidad con las directivas nacionales y con las leyes relacionadas con la eliminación de desechos de laboratorio.
21. No pipetee con la boca.

G. MUESTRAS: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. La sangre ha sido extraída de forma aséptica por extracción en vena y los plasmas o sueros se han preparado utilizando las técnicas estándar de preparación de muestras para análisis clínicos de laboratorio. Ninguna influencia se ha observado durante la preparación de la muestra con citrato, EDTA o heparina.
2. Evite añadir conservantes a las muestras; especialmente ázida de sodio que puede influenciar la actividad enzimática del conjugado, generando resultados de falsos negativos.
3. Las muestras tienen que estar claramente identificadas con códigos o nombres para evitar confusiones a la hora de interpretar los resultados. Cuando el kit es utilizado para el screening de unidades de sangre se recomienda absolutamente etiquetar con códigos de barras de lectura electrónica.
4. Las muestras hemolizadas (rojas) y visiblemente hiperlipémicas (lechosas) tienen que ser desechadas ya que podrían generar falsos resultados. Las muestras que contienen restos de fibrina o grandes partículas o filamentos y cuerpos microbiológicos deberían desecharse ya que podrían originar resultados falsos.
5. Los sueros y plasmas pueden conservarse a +2...8°C hasta cinco días después de la extracción. Para conservar durante largos periodos, las muestras deben congelarse a -20°C durante varios meses. Cualquier muestra congelada no puede congelarse y descongelarse más de una vez ya que esto genera partículas que pueden influenciar el resultado del test.
6. Si se encuentran presentes partículas centrifugadas a 2.000 rpm durante 20 minutos o filtre con filtros a 0.2-0.8µm para limpiar la muestra que se desea probar.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADVERTENCIAS

Estudios realizados sobre un kit abierto no han mostrado ninguna pérdida de actividad importante hasta 1 reutilización del mismo material en 6 meses.

1. Microplacas:

Permita que la microplaca alcance la temperatura ambiente (al menos 1h) antes de abrir la bolsa. Controle que el desecante no se haya vuelto verde oscuro, indicando un defecto de conservación. En este caso llame al servicio de atención al cliente de Adaltis.

Las tiras que no se utilizan deben colocarse en un envase adecuado, en presencia del desecante incluido, bien selladas y conservadas a +2...8°C. Después de su primera apertura las tiras restantes son estables hasta que el indicador de humedad presente en el interior del envase del desecante cambia de amarillo a verde.

2. Control Negativo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

3. Control Positivo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Trate este componente como potencialmente infectado.

4. Calibrador:

Diluya atentamente el contenido liofilizado de la ampolla con el volumen de agua de grado EIA que se muestra en su etiqueta. Mezcle en un vórtex antes de usar.

Trate este componente como potencialmente infectado.

Nota: Una vez diluido el calibrador no es estable. Conserve en alícuotas a -20°C .

5. Solución de Lavado concentrada 20x: (frasco de 50 mL):

Todo el contenido de la solución concentrada 20x tiene que ser diluido con agua bidestilada hasta 1000 ml (el volumen se muestra en la etiqueta) y mezclado bien antes de su uso. Desde el momento que la solución puede presentar formaciones cristalinas, preste atención de disolver todo el contenido. Evite generar espuma durante la preparación porque la presencia de burbujas puede disminuir la eficacia del lavado.

Nota: Una vez diluida la solución de lavado es estable durante 1 semana a $+2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Conjugado:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Preste atención para no contaminar el líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios presentes en el aire. Si este componente tiene que transferirse use solamente contenedores de plástico posiblemente esterilizados.

7. Substrato TMB:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar. Preste atención para no contaminar el líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios presentes en el aire. No exponga a una fuerte iluminación, agentes oxidantes y superficies metálicas. Si este componente tiene que transferirse use solamente contenedores de plástico posiblemente esterilizados.

8. Diluyente del Ensayo:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

9. Solución Bloqueadora:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

10. Diluyente de la Muestra:

Listo para su uso. Mezcle en un vórtex antes de usar.

I. INSTRUMENTACIÓN USADA JUNTO CON EL KIT

1. Las micropipetas deben calibrarse para emitir el correcto volumen necesario para el ensayo y tienen que someterse a una descontaminación regular (alcohol desnaturalizado, lejía al 10%, solución desinfectante hospitalaria) de aquellas partes que podrían entrar en contacto de modo accidental con la muestra. Estas deberían controlarse para mostrar una precisión del 1% y una corrección de $\pm 2\%$. La descontaminación de pulverizaciones o restos de componentes del kit debería realizarse de forma regular.
2. La incubadora ELISA debería calibrarse a 37°C (tolerancia de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) y controlarse de forma regular para asegurar el mantenimiento de la temperatura correcta. Ambas incubadoras en seco y con baños de agua pueden utilizarse para la incubación si los instrumentos están convalidados para incubar tests ELISA.

3. El lavador ELISA es extremadamente importante para que el resultado del ensayo sea positivo. El lavador tiene que ser convalidado atentamente y correctamente optimizado. Normalmente son suficientes 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensación de $350\ \mu\text{L}$ de solución lavado = 1 ciclo) para asegurar que el ensayo del resultado esperado. Se recomienda un intervalo de soaking de 20-30 segundos entre los ciclos. Para establecer correctamente su número, se recomienda realizar un test de prueba con los controles del kit y muestras de referencia bien caracterizadas como positivos o negativos, y controlar la correspondencia con los valores que se muestran debajo de la sección O "Control de calidad interno". La calibración regular del volumen suministrado y el mantenimiento del lavador (descontaminación y limpieza de las agujas) debe realizarse siguiendo las indicaciones del fabricante.
4. Los tiempos de incubación tienen una tolerancia de $\pm 5\%$.
 - ✓ Método de Incubación Breve (para la $1^{\text{a}}/2^{\text{a}}$ incubación la tolerancia está comprendida entre 43 min. y 47 min.; para la 3^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 14 y 16 min.).
 - ✓ Método de Incubación Estándar (para la 1^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 57 min. y 63 min.; para la 2^{a} y 3^{a} incubación la tolerancia está comprendida entre 29 y 31 min.).
5. El lector de microplacas ELISA tiene que estar compuesto por un filtro de lectura de 450nm y por un segundo filtro (620-630nm) para las operaciones del blanco. Sus prestaciones estándar deberían ser (a) amplitud de banda $\leq 10\text{nm}$; (b) intervalo de absorción de 0 a ≥ 2.0 ; (c) linealidad ≥ 2.0 ; (d) repetibilidad $\geq 1\%$. El blanco está determinado según las instrucciones contenidas en la sección "Procedimiento del Ensayo". El sistema óptico del lector tiene que ser calibrado de forma regular para asegurar la medición correcta de la densidad óptica. El mantenimiento debería realizarse con regularidad en conformidad con las instrucciones del fabricante.
6. Cuando se usa una estación de trabajo automatizada para el kit ELISA, todos los pasos críticos (dispensación, incubación, lavado, lectura, manipulación de datos) tienen que ser atentamente controlados, calibrados, y regularmente guardados para conservar la correspondencia con los valores que se muestran en las secciones O "Control de calidad interno". El protocolo del ensayo se debe instalar en el sistema operativo de la unidad y convalidado al igual que el lavador y el lector. Además, la parte de la estación que manipula los componentes líquidos (dispensación y lavado) tiene que ser convalidada y correctamente configurada. Se debe prestar particular atención para evitar el arrastre por parte de las agujas usadas para la dispensación y el lavado. Esto debe ser estudiado y controlado para minimizar la posibilidad de contaminación de las celdas adyacentes. El uso de estaciones de trabajo automatizadas ELISA está recomendado para el screening de sangre cuando el número de muestras que se desea probar es mayor a 20-30 por recorrido de la máquina.

L. CONTROLES Y OPERACIONES PRE ENSAYO

1. Controle la fecha de caducidad del kit, está imprimida en la etiqueta externa de la caja. No utilice el kit si está caducado.

2. Controle que los componentes líquidos no estén contaminados por partículas o agregados visibles a la vista. Controle que el Substrato TMB sea incoloro o azul pálido aspirando un pequeño volumen del mismo con una pipeta de plástico estéril transparente. Controle que el envase no presenta daños durante el transporte y de consecuencia, ninguna pérdida de líquido esté presente en el interior de la caja. Controle que el envase de aluminio, que contiene la microplaca, no esté perforada o dañada.
3. Diluya todo el contenido de la Solución de Lavado concentrada 20x como se describe en la parte de arriba.
4. Diluya el calibrador como se describe en la parte de arriba.
5. Permita a todos los componentes del kit alcanzar la temperatura ambiente (alrededor de 1 h) y después mezclar como se ha descrito.
6. Siguiendo las instrucciones del fabricante, configure la incubadora ELISA a +37°C y prepare el lavador ELISA acercándolo con la solución de lavado diluida. Configure el número correcto de ciclos de lavado como se muestra en la sección I.3.
7. Controle que el lector ELISA esté encendido desde hace al menos 20 minutos antes de la lectura.
8. Si se utiliza una estación de trabajo automatizada, enciéndala, controle las configuraciones y asegúrese de utilizar el protocolo correcto.
9. Controle que las micropipetas estén configuradas al volumen necesario.
10. Controle que todos los instrumentos estén disponibles y listo para ser utilizados.
11. En caso de problemas no continúe realizando el test e informe al supervisor.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo tiene que ser utilizado en conformidad con lo que se indica a continuación, prestando atención de mantener la misma incubación para todas las muestras para probar.

El ensayo puede ser realizado a través de dos procedimientos de incubación. Seleccione aquella más adecuada para su reglamentación:

1. Incubación Estándar (1^a incubación 60 minutos, 2^a y 3^a incubación 30 minutos)
2. Incubación Breve (1^a y 2^a incubación 45 minutos, 3^a incubación 15 minutos)

1. Incubación Estándar - Ensayo Manual:

1. Introduzca el número correcto de micropocillos en el correspondiente soporte. Deje la primera celda vacía para las operaciones del blanco.
2. Dispense 200 µL de Control Negativo en triple, 200 µL de Calibrador en doble y 200 µL de Control Positivo individual en las celdas adecuadas. ¡No diluya Controles y Calibrador porque ya han sido prediluidos y están listos para su uso!
3. Añada 200 µL de Diluyente de Muestras a todas las celdas de las muestras; después dispense 10 µL de muestra en cada celda adecuadamente identificada. Agite bien la placa, evitando desbordamientos y contaminaciones de las celdas adyacentes, para diluir por completo la muestra en su diluyente.

Nota importante: Controle que el color del Diluyente de la Muestra, después de haber añadido la muestra, cambie de verde claro a verde azulado oscuro, indicando que la muestra ha sido añadida.

4. Dispense 50 µL de Diluyente del Ensayo en todas las celdas de controles/calibrador y de las muestras. Controle que el color de las muestras cambie a azul oscuro.
5. Incube la microplaca unos **60 min a +37°C**.
Nota Importante: Solamente cuando el test sea realizado manualmente las tiras tienen que cubrirse con una hoja adhesiva adecuada incluida en el envase. No cubra las tiras cuando se usa un instrumento ELISA automatizado.
6. Lave la microplaca con un lavador automático soltando y aspirando 350 µL/celda de solución de lavado diluida como se muestra en la sección I.3.
7. Pipetee 100 µL de Conjugado Enzimático en todas las celdas excepto en la de blanco, y recubra con la hoja adhesiva. Controle que este componente de color rojo haya sido dispensado en todas las celdas excepto en la A1.

Nota Importante: Atención de no golpear la superficie del plástico interno de la celda con la punta llena de Conjugado. Pueden producirse contaminaciones.

8. Incube la microplaca unos **30 min a +37°C**.
9. Lave las celdas como se muestra en la sección I.3.
10. Pipetee 100 µL de mezcla Substrato TMB en cada celda incluso en aquella del blanco. Incube la microplaca a temperatura ambiente (18-24°C) **durante 30 minutos**.

Nota Importante: No exponga a una fuerte iluminación directa. Puede determinar fondos altos.

11. Pipetee 100 µL de Solución Bloqueadora en cada celda utilizando la misma secuencia de pipeteado que se describe en el punto 10 para detener la reacción enzimática. El añadido de Solución Bloqueadora hará cambiar el control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Mida la intensidad de color de la solución en cada celda, como se describe en la sección 1.5, con un filtro de lectura a 450 nm y posiblemente con un filtro a 620-630nm para las operaciones del blanco en posición A1 de la microplaca.

Notas importantes:

1. Si el segundo filtro no está disponible asegúrese que no se encuentren presentes huellas digitales en el fondo de la microplaca antes de lectura a 450nm. Tales huellas podrían generar falsos positivos.
2. La lectura debe ser realizada inmediatamente después de añadir la Solución Bloqueadora y nunca más de 20 minutos después de tal añadido. Puede producirse una ligera auto-oxidación del substrato y conducir a un resultado de fondo alto.
3. La agitación a 350 ± 150 rpm durante la incubación ha demostrado que la sensibilidad de la dosificación aumenta alrededor del 20%.

2. Incubación Breve - Ensayo Manual:

1. Introduzca el número correcto de micropocillos en el correspondiente soporte. Deje la primera celda vacía para las operaciones del blanco.
2. Dispense 200 µL de Control Negativo en triple, 200 µL de Calibrador en doble y 200 µL de Control

Positivo individual en las celdas adecuadas. ¡No diluya Controles y Calibrador porque ya han sido prediluidos y están listos para su uso!

- Añada 200 µL de Diluyente de Muestras a todas las celdas de las muestras; después dispense 10 µL de muestra en cada celda adecuadamente identificada. Agite bien la placa, evitando desbordamientos y contaminaciones de las celdas adyacentes, para diluir por completo la muestra en su diluyente.

Nota importante: Controle que el color del Diluyente de la Muestra, después de haber añadido la muestra, cambie de verde claro a verde azulado oscuro, indicando que la muestra ha sido añadida.

- Dispense 50 µL de Diluyente del Ensayo en todas las celdas de controles/calibrador y de las muestras. Controle que el color de las muestras cambie a azul oscuro.
- Incube la microplaca unos **45 min a +37°C**.
Nota Importante: Solamente cuando el test sea realizado manualmente las tiras tienen que cubrirse con una hoja adhesiva adecuada incluida en el envase. No cubra las tiras cuando se usa un instrumento ELISA automatizado.
- Lave la microplaca con un lavador automático soltando y aspirando 350 µL/celda de solución de lavado diluida como se muestra en la sección I.3.
- Pipetee 100 µL de Conjugado Enzimático en todas las celdas excepto en la de blanco, y recubra con la hoja adhesiva. Controle que este componente de color rojo haya sido dispensado en todas las celdas excepto en la A1.

Nota importante: Atención de no golpear la superficie del plástico interno de la celda con la punta llena de conjugado. Pueden producirse contaminaciones.

- Incube la microplaca unos **45 min a +37°C**.
- Lave las celdas como se muestra en la sección I.3.
- Pipetee 100 µL de mezcla Substrato TMB en cada celda incluso en aquella del blanco. Incube la microplaca a temperaturas ambiente (18-24°C) durante **15 minutos**.

Nota importante: No exponga a una fuerte iluminación directa. Puede determinar fondos altos.

- Pipetee 100 µL de Solución Bloqueadora en cada celda utilizando la misma secuencia de pipeteado que se describe en el punto 10 para detener la reacción enzimática. El añadido de Solución Bloqueadora hará cambiar el control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
- Mida la intensidad de color de la solución en cada celda, como se describe en la sección 1.5, con un filtro de lectura a 450 nm y posiblemente con un filtro a 620-630nm para las operaciones del blanco en posición A1 de la microplaca.

Notas importantes:

- Si el segundo filtro no está disponible asegúrese que no se encuentren presentes huellas digitales en el fondo de la microplaca antes de lectura a 450nm. Tales huellas podrían generar falsos positivos.
- La lectura debe ser realizada inmediatamente después de añadir la Solución Bloqueadora y nunca más de 20 minutos después de tal añadido. Puede

producirse una ligera auto-oxidación del sustrato y conducir a un resultado de fondo alto.

- La agitación a 350 ± 150 rpm durante la incubación ha demostrado que la sensibilidad de la dosificación aumenta alrededor del 20%.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

Método	Operaciones (Incubación Estándar)	Operaciones (Incubación Breve)
Controles & Calibrador	200 µL	200 µL
Diluyente Muestras y Muestra	200 µL diluyente+ 10 µL muestra	200 µL diluyente+ 10 µL muestra
Diluyente del Ensayo	50 µL	50 µL
1ª incubación	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavado	4-5 ciclos	4-5 ciclos
Conjugado Enzimático	100 µL	100 µL
2ª incubación	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavado	4-5 ciclos	4-5 ciclos
Substrato TMB	100 µL	100 µL
3ª incubación	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Temperatura ambiente (18...24°C)	Temperatura ambiente (18...24°C)
Solución Bloqueadora	100 µL	100 µL
Lectura OD	450/620nm	450/620nm

Un ejemplo de esquema de dispensación se muestra debajo (válido para ambos procedimientos de incubación):

Microplaca

	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										

Leyenda: BLK = Blanco NC = Control Negativo CAL = Calibrador PC = Control Positivo S = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Un control de validación está realizado en los controles y el calibrador cada vez que el kit es utilizado para verificar que las prestaciones del ensayo son conformes sea con los valores OD450/620nm que con los valores esperados y que se muestran en la tabla siguiente:

Control	Requisitos
Pozo en Blanco	< 0.100 OD 450/620nm valor
Control Negativo (NC)	< 0.050 valor medio OD450/620nm después de sustraer el blanco
Calibrador	S/Co >1.1
Control Positivo	>1.000 OD450/620nm valor

Si los resultados del test se corresponde con los requisitos establecidos arriba, pase a la próxima sección.

Si no se corresponden, no pase el paso siguiente y realice los controles siguientes:

Problemas	Control
Pozo en Blanco > 0.100 OD450nm	1. que la solución Substrato no se haya contaminado durante el ensayo
Control Negativo (NC) > 0.050 OD450nm después de sustraer el blanco	<ol style="list-style-type: none"> que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; que se haya utilizado la solución correcta de lavado y que el lavador se haya puesto en funcionamiento antes de su uso; que ningún error haya sido cometido durante el procedimiento del ensayo (dispensación del control positivo en lugar del negativo); que no se haya producido ninguna contaminación del control negativo o de sus celdas a causa de salpicaduras de las muestras positivas o del conjugado enzimático; que las micropipetas no estén contaminadas con muestras positivas o conjugado enzimático; que las agujas del lavador no estén bloqueadas o parcialmente obstruidas.
Calibrador S/Co < 1.1	<ol style="list-style-type: none"> que los procedimientos hayan sido realizados correctamente; que ningún error se haya producido durante su distribución (p. ej. dispensación del control negativo en lugar del calibrador); que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; que no se haya producido ninguna contaminación externa del calibrador.
Control Positivo <1.000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> que los procedimientos hayan sido realizados correctamente; que ningún error haya sido cometido en la distribución del control (dispensación del control negativo en lugar del positivo); En este caso el control negativo mostrará un OD450nm > 0.150 que el procedimiento de lavado y las configuraciones del lavador sean validadas según los estudios de pre cualificación; que no se haya producido ninguna contaminación externa del control positivo.

Si se ha verificado alguno de los problemas citados anteriormente, informe al supervisor para otras acciones.

P. RESULTADOS

Los resultados del test están calculados basándose en la media de un valor de cut-off determinado con la fórmula siguiente:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC medio} + 0.350$$

El valor hallado para el test es utilizado para interpretar los resultados como se describe en el apartado siguiente.

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del test están interpretados como la relación entre el OD450nm de la muestra y el valor del Cut-Off (o S/Co) en conformidad con la tabla siguiente:

S/Co	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

Un resultado negativo indica que el paciente no está infectado por HCV o que la unidad de sangre puede ser sometida a transfusión.

Aquellos pacientes que muestran un resultado equívoco deberían probarse nuevamente sobre una muestra extraída 1-2 semanas después. La unidad de sangre no debería ser sometida a transfusión.

Un resultado positivo indica la presencia de la infección por HCV, por lo que el paciente debería ser tratado de consecuencia y la unidad de sangre descartada.

Notas importantes:

- La interpretación de los resultados debería ser realizada bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio.
- Cualquier resultado positivo debería confirmarse por un método alternativo capaz de detectar los anticuerpos IgG e IgM (test de confirmación) antes de formular un diagnóstico de hepatitis viral.
- Como se ha demostrado en la valoración de las prestaciones del producto, el análisis es capaz de detectar las seroconversiones por anticuerpos anti-HCV core antes de otros kit que se encuentran en el comercio. ¡Por lo tanto un resultado positivo, no confirmado, con estos kit comerciales no tiene que ser excluido como un resultado falso positivo! La muestra tiene que ser sometida a un test de confirmación.
- Desde el momento que el ensayo es capaz de determinar incluso anticuerpos de clase IgM, podrían detectarse discrepancias con otros productos comerciales para determinar anticuerpos anti HCV sin conjugado anti IgM. La positividad real de la muestra para los anticuerpos HCV debería confirmarse examinando también la reactividad IgM, importante para diagnosticar la infección HCV.
- Cuando los resultados son comunicados del laboratorio a un centro informático, preste atención para no transferir datos incorrectos.
- El diagnóstico de hepatitis viral debe realizarse y comunicarse al paciente solamente por parte de personal médico cualificado.

A continuación se muestra un ejemplo de cálculo:

Los datos siguientes no deben utilizarse en lugar de los datos reales obtenidos por el usuario:

Control Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Valor Medio: 0.020 OD450nm Menor de 0.050 – Aceptado

Control Positivo: 2.189 OD450nm

Más alto que 1.000 – Aceptado

Cut-Off = 0.020 + 0.350 = 0.370

Calibrador: 0.550 - 0.530 OD450nm

Valor Medio: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4
S/Co más alto que 1.1 – Aceptado

Muestra 1: 0.070 OD450nm

Muestra 2: 1.690 OD450nm

Muestra 1 S/Co < 0.9 = negativo

Muestra 2 S/Co < 1.1 = positivo

R. RENDIMIENTO

La Valoración del Rendimiento ha sido conducido en conformidad con lo citado en las Common Technical Specifications o CT (art.5, Capítulo 3 de IVD Directiva 98/79/EC) y a ambos procedimientos de incubación (estándar y breve).

1. LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección del ensayo ha sido calculado utilizando el procedimiento de incubación breve por medio del British Working Standard para anti-HCV, NIBSC código 06/188-006. La tabla siguiente muestra los valores medios de OD450nm de este estándar diluido en plasma negativo y después examinado.

Dilución	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
Plasma Negativo	0,25	0,20	0,20

Además la muestra codificada Accurun 1 - series 3000 – entregada por Boston Biomedica Inc., USA, ha sido valorada “en su totalidad” mostrando los resultados siguientes:

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. ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICA Y SENSIBILIDAD

La Valoración del Rendimiento del dispositivo ha sido conducida en una prueba externa conducida en más de 5.000 muestras.

2.1 Especificidad Diagnóstica

Está definida como la probabilidad del ensayo de indicar negativo en ausencia de un análisis específico. Se han examinado un total de más de 5.000 donantes, incluidos donantes primerizos.

La especificidad diagnóstica es constatada contra un kit aprobado US FDA.

Se han examinado 5.043 donantes suministrando una especificidad del 99.5%.

Se han examinado 210 pacientes hospitalizados para HCV; y se ha detectado una especificidad diagnóstica del 99.5%. Además, la especificidad diagnóstica es comprobada examinando 162 muestras potencialmente interferentes (otras enfermedades infecciosas, anticuerpos positivos E.coli, pacientes con enfermedades hepáticas no virales, pacientes con diálisis, mujeres embarazadas, hemolizados, lipémicos, etc.). Se ha diagnosticado un valor de especificidad del 100%.

No se ha observado ninguna falsa reactividad debida al método de preparación de muestras. Sea los plasmas,

derivados con diferentes técnicas estándar de preparación (citrato, EDTA y heparina), y sueros se han utilizado para determinar los valores de especificidad. Se han examinado muestras congeladas, para comprobar interferencias debidas a la cosecha y conservación. No se ha observado ninguna interferencia.

2.2 Sensibilidad Diagnóstica

Está definida como la probabilidad del ensayo de indicar positivo en ausencia de un análisis específico. La sensibilidad diagnóstica ha sido asegurada externamente sobre un número total de 348 muestras; una sensibilidad diagnóstica del 100% ha sido detectada. Internamente se han probado más de 50 muestras positivas, suministrando todavía un valor de sensibilidad diagnóstica del 100%.

Se han probado muestras positivas por infecciones provocadas por genotipos diferentes de HCV.

Además se ha estudiado la mayor parte de los paneles de seroconversión suministrados por Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) y Zeptometrix, USA, (HCV).

A continuación se muestran los resultados para algunos de ellos.

Panel	Nº muestras	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

Nota:

1. Muestras Positivas detectadas

2. HCV v.3.0

Por último el producto ha sido probado en el panel EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, suministrado por Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con los resultados siguientes:

Panel EFS Ac HCV

Muestra	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Resultados esperados
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativo
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positivo
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positivo
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positivo
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positivo
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positivo

3. PRECISION

Se ha calculado en cinco muestras, una negativa y cuatro positivas, examinadas en 4 repeticiones en seis run separadas.

Los resultados se muestran a continuación:

Resultados intra-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1° Lote (procedimiento de incubación breve)

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Inter Ensayo	Intra Ensayo	Total
Negativo	0.03	6.66	10.56	12.48
Positivos	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

Resultados intra-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1° Lote (procedimiento de incubación largo)

Muestra	S/Co Media	Precisión - %CV		
		Inter Ensayo	Intra-Ensayo	Total
Negativo	0.04	4.67	12.34	13.19
Positivos	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

Resultados inter-lote: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1°, 2° y 3° Lote (procedimiento incubación breve)

Muestra	Precisión - %CV		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Negativo	8.65	8.29	6.13
Calibrador	4.98	4.44	5.38
Positivo	4.11	3.11	1.37

La variabilidad mostrada en las tablas no ha resultado en la clasificación errónea de las muestras.

S. SUGERENCIAS PARA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

La adhesión al procedimiento y a las especificaciones, así como el uso correcto de los reagentes y la dispensación adecuada, pueden evitar los tipos de error siguientes:

ERROR	POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS
OD muy diferentes ($\pm 50\%$) de aquellas que se muestran en el QC	-volumen incorrecto de dispensación de los reagentes (sugerencia: controle la correspondencia entre el volumen configurado en las pipetas y aquel requerido por el ensayo, calibrarlas nuevamente) -temperatura incorrecta o tiempo de incubación incorrecto (sugerencia: mantenimiento más detallado de la incubadora, anote el inicio de la incubación) -error en la realización de los lavados y en la lectura fotométrica (sugerencia: controle el funcionamiento o las configuraciones de los correspondientes instrumentos) -contaminación del Substrato o del Conjugado (sugerencia: utilice solamente contenedores de plástico desechable limpios)

Resultados poco reproducibles	-volumen de dispensación de los reagentes y de las muestras no constante (sugerencia: controle la precisión de las pipetas y la correspondencia entre el volumen dispensado y aquel necesario para el ensayo; calibrarlas nuevamente) -error en la realización de los lavados o de la lectura (sugerencia: controle el funcionamiento o las configuraciones de los correspondientes instrumentos) -contaminación del Substrato (sugerencia: utilice solamente contenedores de plástico desechable limpios) -contaminación o degradación de los reagentes (sugerencia: utilice puntas adecuadas, contenedores de plástico desechable y agua destinada o equivalente)
Ninguna reacción colorimétrica después de añadir el Substrato	-algunos reagentes no han sido dispensados -fuerte contaminación del Conjugado o del Substrato -realización errónea del procedimiento del ensayo (p. ej dispensación accidental de los reagentes en una secuencia incorrecta o por el contenedor incorrecto, etc.)
Reacción demasiado blanca (OD demasiado bajas)	-tiempo de incubación demasiado breve, temperatura de incubación demasiado baja -dilución del conjugado errónea
Reacción demasiado intensa (OD demasiado altas)	-dilución del conjugado errónea -tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta -calidad decadente del agua utilizada para la solución de lavado (bajo grado de desonización) -lavado insuficiente (conjugados no eliminados correctamente)
Resultados inexplicables	-contaminación de las pipetas, de las puntas o de los contenedores -lavado inconstante e insuficiente (conjugados no eliminados correctamente)
CV% interensayo elevado	-reagentes y/o no llevadas a temperaturas ambientes antes de usar - el lavador para microplacas no lava correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)
CV% intraensayo elevado	-condiciones de incubación no constantes (tiempo, temperatura) -controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con mismos intervalos) (controle la secuencia de dispensación) -variabilidad intrínseca de los operadores

T. AUTOMACIÓN

El proceso que se describe en estas instrucciones de uso es solamente para el test en manual. Cuando se utilizan analizadores automáticos, es necesario seguir las instrucciones que se describen en los manuales de uso del mismo dispositivo. Todo laboratorio debe seguir sus propios procesos de validación interna demostrando la compatibilidad con los sistemas automáticos.

U. LIMITACIONES

Repetibles resultados falsos positivos, no confirmados por el RIBA de confirmación o técnicas similares, se han valorado como inferiores al 0,1% de la población normal. Las muestras congeladas que contienen partículas de fibrina o agregados después del descongelación han mostrado generar falsos positivos.

BIBLIOGRAFIA

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Lire attentivement cette notice avant d'utiliser le produit et suivre les instructions.
La fiabilité des résultats d'analyse ne peut pas être garantie si ces instructions ne sont pas strictement respectées.



Fabriqué par :
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

fr

SYMBOLES UTILISÉS SUR LES ÉTIQUETTES

Français 							
	Dispositif médical de diagnostic in vitro	Référence catalogue	Numéro de Lot	Attention : lire les Instructions avant l'Utilisation	Limites de température	Date de péremption	Nombre de tests
	Fabriqué par...	Ne pas exposer à la lumière	Date de fabrication	Microplaque	Contrôle positif	Contrôle négatif	Calibrateur
	Conjugué	Diluant pour échantillon	Substrat TMB	Solution d'Arrêt (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Solution de Lavage Concentré 20x	Diluant dd'analyse	A Reconstituer avec x mL
	Risque biologique	Danger	Attention				

Attention:

Solution d'Arrêt classée Skin Corr. 1A



- **Mention d'avertissement:**
Danger
- **Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage:**
Acide sulfurique
- **Mentions de danger:**
H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- **Conseils de prudence:**
P260 Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P303+P361+P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): Enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/Se doucher.
P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.
P405 Garder sous clef.
P501 Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Attention :

Contrôle Négatif, Contrôle Positif, Calibrateur, Conjugué, Diluant pour échantillon, Diluant de dosage et Solution de Lavage Concentré 20x classé comme : Skin Sens. 1



- **Mention d'avertissement:**
Attention
- **Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage:**
mélange de: 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- **Mention de danger:**
H317 Peut provoquer une allergie cutanée.
- **Conseils de prudence:**
P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P321 Traitement spécifique (voir sur cette étiquette).
P333+P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.
P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : Laver abondamment à l'eau.
P501 Éliminer le contenu/réceptacle conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

Pour les Fiches de Données de Sécurité, consulter www.adaltis.net.

A. UTILISATION

Quatrième génération de dosage immuno-enzymatique (ELISA) pour la détermination d'anticorps contre le virus de l'hépatite C dans le plasma humain (EDTA, héparine et citrate) et des sérums. Le kit peut être utilisé pour le criblage d'unités de sang de patients contaminés par le HCV.

Pour diagnostic in vitro uniquement.

B. INTRODUCTION

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) définit l'hépatite C comme suit:

« L'hépatite C est une infection virale du foie qui avait été désignée comme transmise par voie parentérale « non A, non de l'hépatite B » jusqu'à l'identification de l'agent causal en 1989. La découverte et la caractérisation du virus de l'hépatite C (HCV) ont conduit à la compréhension de son rôle primordial dans la post-hépatite transfusionnelle et de sa tendance à provoquer une infection persistante.

Le HCV est la principale cause de l'hépatite aiguë et de maladie chronique du foie comprenant la cirrhose et le cancer. Globalement, on estime que 170 millions de personnes sont chroniquement contaminées par le HCV et que 3 à 4 millions de personnes sont infectées chaque année. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. Les principales causes de l'infection par le HCV dans le monde sont la transfusion de sang non contrôlé, et la réutilisation de seringues et d'aiguilles non stérilisées adéquatement. Aucun vaccin n'est actuellement disponible pour prévenir l'hépatite C et le traitement de l'hépatite chronique C est trop coûteux pour la plupart des personnes dans les pays en voie de développement. Ainsi, d'un point de vue global, le plus grand impact sur la charge de morbidité de l'hépatite C sera probablement atteint en concentrant les efforts sur la réduction du risque de transmission du HCV d'expositions nosocomiales (par exemple, les transfusions sanguines, les pratiques d'injection à risque) et les comportements à haut risque (utilisation de drogues injectables par exemple).

L'hépatite C (HCV) est l'un des virus (A, B, C, D et E), qui représentent ensemble la grande majorité des cas d'hépatite virale. Il s'agit d'un virus à ARN enveloppé de la famille des Flaviviridae, qui semble avoir un spectre d'hôte étroit. Les humains et les chimpanzés sont les seules espèces connues sensibles à l'infection, avec les deux espèces qui développent une maladie similaire. Une caractéristique importante de ce virus est la mutabilité relative de son génome, qui à son tour est probablement liée à la forte propension (80%) d'induire une infection chronique. Le HCV est regroupé en plusieurs génotypes distincts qui peuvent être importants dans la détermination de la gravité de la maladie et de la réponse au traitement.

La période d'incubation de l'infection par le HCV, avant l'apparition des symptômes cliniques varie de 15 à 150 jours. Dans les infections aiguës, les symptômes les plus courants sont la fatigue et la jaunisse ; cependant, la

majorité des cas (entre 60 % et 70 %), même ceux qui développent une infection chronique, sont asymptomatiques. Environ 80% des patients nouvellement infectés développent une infection chronique. La cirrhose se développe chez environ 10 % à 20 % des personnes atteintes d'une infection chronique et le cancer du foie se développe dans 1 % à 5 % des personnes atteintes d'une infection chronique sur une période de 20 à 30 ans. La plupart des patients souffrant de cancer du foie sans être atteints de l'infection par le virus de l'hépatite B présentent des preuves de l'infection par le HCV. Les mécanismes par lesquels l'infection à HCV conduit à un cancer du foie sont encore mal connus. L'hépatite C aggrave également la sévérité de la maladie hépatique sous-jacente quand il coexiste avec d'autres conditions hépatiques. En particulier, une maladie du foie progresse plus rapidement chez les personnes atteintes de la maladie alcoolique du foie et infection par le HCV. Le HCV se transmet principalement par contact direct avec du sang humain. La transmission par des transfusions sanguines qui ne sont pas dépistées pour l'infection par le HCV, grâce à la réutilisation d'aiguilles mal stérilisées, de seringues ou d'autre matériel médical, ou par le partage de seringues chez les usagers de drogues, est bien documentée. La transmission sexuelle et périnatale peut également se produire, bien que moins fréquemment. D'autres modes de transmission tels que les pratiques sociales, culturelles et comportementales en utilisant des procédures percutanées (par exemple de l'oreille et piercing, circoncision, tatouage) peuvent se produire si un équipement mal stérilisé est utilisé. Le HCV ne se transmet pas par les éternuements, les accolades, la toux, la nourriture ou l'eau, le partage des ustensiles de cuisine, ou un contact occasionnel.

Dans les pays développés et en voie de développement, les groupes à haut risque comprennent consommateurs de drogues injectables, les receveurs de sang, les hémophiles, les patients dialysés et les personnes à partenaires sexuels multiples qui ont des rapports sexuels non protégés. Dans les pays développés, on estime que 90 % des personnes atteintes d'une infection chronique par le HCV sont les utilisateurs de drogues injectables, anciens et actuels et ceux ayant des antécédents de transfusion de sang non testé ou de produits sanguins. Dans de nombreux pays en développement, où le sang et les produits sanguins sont encore utilisés, les principaux moyens de transmission sont du matériel d'injection non stérile et la transfusion de sang. En outre, les personnes qui pratiquent la scarification et la circoncision traditionnelles sont à risque si elles utilisent ou ré-utilisent des outils non stérilisés.

L'OMS estime que 170 millions de personnes, soit 3 % de la population mondiale, sont infectées par le HCV et risquent de développer une cirrhose et/ou un cancer du foie. La prévalence de l'infection par le HCV dans certains pays d'Afrique, de la Méditerranée orientale, de l'Asie du Sud-est et du Pacifique occidental (lorsque les données de prévalence sont disponibles) est élevée par rapport à certains pays d'Amérique du Nord et en Europe.

Les tests de diagnostic pour le HCV sont utilisés pour prévenir l'infection par le dépistage de sang du donneur

et de plasma, pour établir le diagnostic clinique et de prendre de meilleures décisions concernant la gestion médicale d'un patient. Les tests diagnostiques disponibles dans le commerce aujourd'hui sont basés sur la méthode immuno-enzymatique (EIA) pour la détection d'anticorps spécifiques du HCV. Les EIA peuvent détecter plus de 95 % des patients à infection chronique mais peuvent détecter que 50 % à 70 % des infections aiguës. Un test EIA recombinant (RIBA) qui identifie des anticorps qui réagissent avec les antigènes du HCV est souvent utilisé à titre de test supplémentaire pour la confirmation d'un résultat positif EIA. Le test du HCV circulant par amplification des tests ARN (par exemple polymérase chain reaction ou PCR, ramifié test d'ADN) est également utilisé pour la confirmation des résultats sérologiques ainsi que pour évaluer l'efficacité du traitement antiviral. Un résultat positif indique la présence d'une infection active et un risque de propagation de l'infection et/ou de développement de la maladie chronique du foie.

Les médicaments antiviraux tels que l'interféron seul ou en association avec la ribavirine peuvent être utilisés pour le traitement de personnes souffrant d'hépatite C chronique, mais le coût du traitement est très élevé. Le traitement avec l'interféron seul est efficace chez 10 % à 20 % des patients. L'interféron associé à la ribavirine est efficace chez 30 % à 50 % des patients. La ribavirine ne semble pas être efficace lorsqu'elle est utilisée seule.

Il n'existe aucun vaccin contre le HCV. La recherche est en cours, mais la forte mutabilité du génome du HCV complique le développement de vaccins. Le manque de connaissances de toute réponse immunitaire protectrice après une infection par le HCV constitue également un obstacle à la recherche sur les vaccins. On ne sait pas si le système immunitaire est capable d'éliminer le virus.

Certaines études, cependant, ont montré la présence d'anticorps neutralisants du virus chez les patients infectés par le HCV. En l'absence d'un vaccin, toutes les précautions pour prévenir l'infection doivent être prises, y compris (a) le dépistage et les tests sanguins et d'organes donateurs; (b) l'inactivation des virus de produits dérivés du plasma; (c) la mise en œuvre et la maintenance des pratiques de contrôle des infections dans les établissements de soins de santé, y compris la stérilisation du matériel médical et dentaire; (d) l'incitation au changement de comportement parmi les travailleurs du secteur public et des soins de santé généraux pour réduire la sur-utilisation des injections et à utiliser des pratiques d'injection sécuritaires; et (e) la réduction du risque en apportant conseil aux personnes fortement exposées à la drogue et aux pratiques sexuelles.

Le génome code pour des composants de structure, une protéine de nucléocapside et deux glycoprotéines d'enveloppe, et des composants fonctionnels impliqués dans la réplication du virus et le traitement de la protéine. La région de codage de la nucléocapside semble être le plus conservateur parmi les isolats obtenus partout dans le monde.

C. PRINCIPE DU TEST

Des plaques microtitre sont recouvertes d'antigènes spécifiques du HCV provenant de régions du «noyau» et «ns» codant pour des déterminants antigéniques conservateurs et immunodominants (base peptide recombinant NS3, NS4 et NS5 peptides).

La phase solide est d'abord traitée avec l'échantillon dilué et Ab sont capturés HCV, si présents, par les antigènes. Après élimination par lavage de tous les autres composants de l'échantillon, dans la deuxième incubation les anticorps HCV liés, ainsi que les IgG et IgM, sont détectés par addition d'anticorps Higg & Manti spécifiques polyclonaux, marqués à la peroxydase (HRP).

L'enzyme capturé sur la phase solide, qui agit sur le mélange de substrat TMB, génère un signal optique qui est proportionnel à la quantité d'anticorps anti-HCV présents dans l'échantillon. Une valeur seuil permet d'interpréter les densités optiques résultant d'anticorps HCV négatifs et positifs

D. COMPOSITION

Le kit contient des réactifs pour 96 tests (réf. 071067), 192 tests (réf. 071064), ou 480 tests (réf 071068).

Plaque microtitre	1
Contrôle Négatif	1x4 mL/flacon
Contrôle Positif	1x2 mL/flacon
Calibrateur	2 flacons
Tampon de l concentré 20x	1x50 mL/flacon
Conjugué	1x16 mL/flacon
Diluant pour échantillon	1x50 mL/flacon
Substrat TMB	1x16 mL/flacon
Solution d'Arrêt	1x15 mL/flacon
Diluant de Dosage	1x8 mL/flacon
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	2
Nombre de tests	96
Référence	071067

Plaque microtitre	2
Contrôle Négatif	2x4 mL/flacons
Contrôle Positif	1x4 mL/flacon
Calibrateur	3 flacons
Tampon de lavage concentré 20x	2x50 mL/flacons
Conjugué	2x16 mL/flacons
Diluant pour échantillon	2x50 mL/flacons
Substrat TMB	2x16 mL/flacons
Solution d'Arrêt	2x15 mL/flacons
Diluant de Dosage	2x8 mL/flacons
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	4
Nombre de tests	192
Référence	071064

Plaque microtitre	5
Contrôle Négatif	1x20 mL/flacon
Contrôle Positif	1x10 mL/flacon
Calibrateur	7 flacons
Solution de Lavage Concentré 20x	5x50 mL/flacons
Conjugué	2x40 mL/flacons
Diluant pour échantillon	5x50 mL/flacons
Substrat TMB	2x40 mL/flacons
Solution d'Arrêt	2x40 mL/flacons
Diluant de Dosage	1x40 mL/flacon
Feuilles adhésives pour la fermeture hermétique des plaques microtitre	10
Nombre de tests	480
Référence	071068

1. Plaque microtitre

12 barrettes de 8 puits revêtus de peptide de noyau, peptides NS3 recombinant, NS4 et NS5. Les plaques sont hermétiquement emballées sous sachet en aluminium avec dessicatif.

La plaque microtitre doit être amenée à température ambiante (18...24°C) avant d'ouvrir le sachet. Les barrettes non utilisées doivent être rangées dans le sachet, qui doit être scellé et conservé à 2...8°C, en présence de l'agent dessicatif.

2. Contrôle Négatif

Prêt à l'usage. Il contient 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1, 2% de caséine en tant que base de protéines et 0,1% de Proclin 150 à titre de conservateur. Le contrôle négatif est de couleur vert olive codé.

3. Contrôle Positif

Prêt l'usage. Il contient des protéines du sérum de chèvre à 1%, des anticorps humains anti- HCV positifs, un tampon 10 mM Na-citrate pH 6,0 ± 0,1, 0,5% de Tween 20, 0,09% Na-azide et 0,1% de Proclin 150 en tant que conservateurs. Le contrôle positif est de couleur vert foncé codé.

Remarque importante : *L'absence d'agents pathogènes viables dans le contrôle positif ne peut pas être pleinement assurée, le réactif doit donc être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.*

4. Calibrateur

Calibrateur lyophilisé. À dissoudre avec le volume de l'eau de qualité EIA rapporté sur l'étiquette. Il contient des protéines de sérum bovin fœtal, anticorps humains anti-HCV dont le contenu est calibré sur l'a norme de travail NIBSC code 06/188-006, un tampon 10 mM Na-citrate pH du à 6,0 ± 0,1, 0,3 mg/mL de sulfate de gentamicine et 0,1% de Proclin 150 à titre de conservateurs.

Remarque importante : *l'absence d'agents pathogènes viables dans le calibrateur ne peut pas être pleinement assurée, le réactif doit donc être manipulé comme un produit potentiellement dangereux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.*

Remarque : *Le volume nécessaire pour dissoudre le contenu de la fiole peut varier d'un lot à l'autre. Veuillez utiliser le volume adéquat indiqué sur l'étiquette.*

5. Tampon de Lavage Concentré 20x

Solution concentrée à 20 volumes. Une fois diluée, la solution de lavage (tampon de lavage dilué) contient 10 mM de tampon de phosphate pH 7,0 ± 0,2, 0,05% de Tween 20 et 0,05% de Proclin 150.

Après dilution, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à 2...8°C.

6. Conjugué

Réactif prêt à l'emploi De couleur rouge codée. Il contient des anticorps polyclonaux de chèvre conjugués à de la peroxydase de raifort à IgG et IgM humains, 5% de BSA, 10 mM de tampon de citrate pH 6,4 ± 0,1, 0,1% de Proclin et 0,05% de Tween 20 comme agent de conservation.

7. Substrat TMB

Composant prêt à l'emploi. Il contient 50 mM de tampon citrate-phosphate pH 3.5-3.8, 4% de diméthylsulfoxyde, 0,03% de tétra-méthyl-benzidine ou TMB et 0,02% de peroxyde d'hydrogène ou H₂O₂. Mélanger doucement avant utilisation.

Remarque : *À conserver à l'abri de la lumière car sensible à un fort éclairage.*

8. Diluant de Dosage

Composant prêt à l'emploi. Il contient du sérum de chèvre, 10 mM de tris solution tamponnée à pH 8,0 ± 0,1 contenant 0,1% de Proclin 150 et 0,09% d'azide de Sodium pour le prétraitement des échantillons et les témoins dans la plaque, le blocage de l'interférence.

9. Solution d'Arrêt

Composant prêt à l'emploi.

Il contient une solution de H₂SO₄ 0,3 M. Mélanger doucement avant utilisation.

10. Diluant pour échantillon

Composant prêt à l'emploi et de couleur vert foncé codée. Il contient 1% de caséine, 10 mM de tampon Na-citrate pH 6,0 ± 0,1 et 0,1% de Proclin 150 en tant que conservateur.

À utiliser pour diluer l'échantillon.

Remarque: *Le diluant passe du vert olive au vert bleuâtre foncé en présence de l'échantillon.*

E. MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

1. Micropipettes calibrées (200 µL et 10 µL) et embouts jetables en plastique.
2. Eau de qualité EIA (bidistillée ou déminéralisée, traitée au charbon actif pour éliminer les produits chimiques oxydants utilisés en tant que désinfectants).
3. Minuterie réglable jusqu'à 60 minutes au moins.
4. Papier absorbant.
5. Incubateur thermostatique calibré pour plaque microtitre ELISA (sec ou humide) réglé sur +37°C.
6. Lecteur de plaques microtitre ELISA avec filtre à 450 nm (lecture) et, si possible, avec filtre à 620-630 nm (soustraction des blancs).
7. Station de lavage calibrée pour plaques microtitre ELISA.
8. Vortex ou instrument de mélange similaire.

F. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

1. Le kit doit être utilisé uniquement par un personnel technique qualifié et correctement formé, sous la supervision d'un médecin responsable du laboratoire.
Cette notice doit être lue attentivement avant l'utilisation du produit.
2. La Fiche de données de sécurité doit être lue attentivement avant l'utilisation du produit.
3. Lorsque le kit est utilisé pour le dépistage d'unités de sang et de composants sanguins, il doit être utilisé dans un laboratoire certifié et qualifié par l'autorité nationale compétente (Ministère de la Santé ou entité similaire) pour mener à bien ce type d'analyse.
4. Tout le personnel participant à la réalisation du test doit porter des vêtements de protection, des gants de laboratoire sans talc et des lunettes. L'utilisation de dispositifs pointus (aiguilles) ou coupants (lames) doit être évitée. Tout le personnel impliqué doit être formé sur les procédures de biosécurité, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis et signalé à l'Institut national de la publication de Santé : « prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux » éd. 1984.
5. Tout le personnel impliqué dans la manipulation des échantillons doit être vacciné contre le VHB et le VHA, pour lesquels des vaccins sûrs et efficaces sont disponibles.
6. L'environnement de laboratoire doit être contrôlé afin d'éviter les contaminants tels que la poussière ou des agents microbiens air, lors de l'ouverture des flacons du kit et des plaques microtitre et lors du test. Protéger le substrat (TMB) de la lumière forte et éviter les vibrations de la surface de la table sur laquelle le test est effectué.
7. Dès réception, conserver le kit à 2...8°C dans un réfrigérateur à température contrôlée ou une chambre froide.
8. Ne pas échanger les composants entre différents lots de kits. Il est recommandé de ne pas échanger les composants de deux kits d'un même lot.
9. Vérifier que les réactifs sont clairs et ne contiennent pas de particules ou grumeaux lourds visibles. Le cas échéant, aviser le responsable du laboratoire en vue des procédures nécessaires pour le remplacement du kit.
10. Éviter la contamination croisée entre les échantillons de sérum/plasma en utilisant des embouts jetables et en les changeant après chaque échantillon.
11. Éviter la contamination croisée entre les réactifs en utilisant des embouts jetables et en les changeant après utilisation.
12. Ne pas utiliser le kit après la date de péremption indiquée sur l'emballage externe et les étiquettes intérieures (flacons).
13. Traiter tous les échantillons comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Tous les échantillons de sérum humain doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2, comme recommandé par le Center for Disease Control, Atlanta, États-Unis, conformément aux indications des Instituts de la publication de Santé : « prévention des risques biotechnologiques en laboratoires microbiologiques et biomédicaux », éd. 1984.

14. L'utilisation de matière plastique-céramique jetable est recommandée dans la préparation des composants liquides ou lors du transfert des composants à des postes de travail informatisés, afin d'éviter toute contamination croisée.
15. Les déchets produits lors de l'utilisation du kit doivent être éliminés conformément aux directives et lois nationales en matière de déchets de laboratoire et substances chimiques et biologiques. En particulier, les déchets liquides générés par le procédé de lavage, de résidus de contrôles et des échantillons doivent être traités comme s'ils étaient potentiellement infectieux et inactivés avant élimination. Les procédures d'inactivation suggérées sont le traitement avec une concentration finale de 10% d'eau de javel pendant 16-18 heures ou l'inactivation thermique par autoclave à 121°C pendant 20 min.
16. Les fuites accidentelles provenant d'échantillons et les opérations doivent être adsorbées avec du papier absorbant imbibé d'eau de Javel, puis avec de l'eau. Les papiers doivent ensuite être jetés dans des conteneurs appropriés pour déchets de laboratoire/d'hôpital.
17. La Solution d'Arrêt contient 0,3M d'acide sulfurique. Éviter le contact avec la peau et les yeux. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.
18. Se débarrasser des solutions de réactifs contenant de l'azote de sodium comme agent de conservation selon les réglementations locales, provinciales et nationales. Pour éliminer les réactifs contenant de l'azote, rincer à l'aide de grandes quantités d'eau. Éliminer avec prudence car l'azote de sodium peut former des composés explosifs au contact prolongé avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre.
19. Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
20. D'autres déchets générés par l'utilisation du kit (ex. embouts pour échantillons et contrôles, plaques microtitre usagées) doivent être traités comme étant potentiellement infectieux et éliminés conformément aux directives et lois nationales en matière de déchets de laboratoires.
21. Ne pas prélever en aspirant avec la bouche.

G. ÉCHANTILLONS : PRÉPARATION ET MISES EN GARDE

1. Le sang est prélevé de manière aseptique par ponction veineuse et le plasma ou le sérum est préparé en utilisant des techniques standard de préparation des échantillons pour analyse en laboratoire clinique. Aucune influence n'a été observée dans la préparation de l'échantillon avec le citrate, l'EDTA et l'héparine.
2. Éviter tout ajout de conservateurs aux échantillons ; en particulier de l'azide de sodium car ce produit chimique affecterait l'activité enzymatique du conjugué, générant des résultats faussement négatifs.
3. Les échantillons doivent être clairement identifiés par des codes ou des noms afin d'éviter une mauvaise interprétation des résultats. Lorsque le kit est utilisé

pour le dépistage d'unités de sang, l'étiquetage de code à barres et la lecture électronique sont fortement recommandés.

4. Hémolysé (rouge) et visiblement hyperlipémique (« laiteux ») les échantillons doivent être jetés car ils pourraient générer des résultats erronés. Les échantillons contenant des résidus de fibrine ou particules lourdes ou de filaments microbiens et les organismes doivent être jetés car ils pourraient donner lieu à de faux résultats.
5. Les sérums et le plasma peuvent être conservés à +2...8°C jusqu'à cinq jours après la collecte. Pour les périodes de stockage plus longues, les échantillons peuvent être conservés congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Les échantillons congelés ne doivent pas être congelés/décongelés plus d'une fois car cela peut générer des particules qui pourraient affecter le résultat du test.
6. Si des particules sont présentes, centrifuger à 2 000 tours par minute pendant 20 min ou filtrer à l'aide de filtres de 0,2-0.8µ pour nettoyer l'échantillon à tester.

H. PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET MISES EN GARDE

Une étude menée sur un kit ouvert n'a pas signalé de perte d'activité correspondante, jusqu'à 1 réutilisation de l'appareil et jusqu'à 6 mois.

1. Plaque microtitre:

Laisser la microplaque atteindre la température ambiante (environ 1 heure) avant d'ouvrir le sachet. Vérifier que le dessicatif n'a pas tourné au vert foncé, indiquant un défaut de fabrication. Le cas échéant appeler le Service Clientèle d'Adaltis.

Les barrettes non utilisées doivent être placées à l'intérieur du sachet en aluminium, avec le dessicatif fourni, bien fermé et stocké à +2...8°C. Après la première ouverture, bandes restantes sont stables jusqu'à l'indicateur d'humidité à l'intérieur du sachet dessicatif passe du jaune au vert.

2. Contrôle négatif :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

3. Contrôle Positif:

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

4. Calibrateur:

Dissoudre soigneusement le contenu du flacon lyophilisé avec le volume d'eau de qualité EIA signalé sur l'étiquette. Mélangez bien le vortex avant utilisation. Manipuler ce composant comme potentiellement infectieux.

Remarque : Lorsque dissous le calibrateur n'est pas stable. Magasin à -20°C.

5. Solution de Lavage Concentré 20x (flacon de 50 mL):

La totalité du contenu de la solution concentrée 20x doit être diluée avec de l'eau de qualité EIE jusqu'à 1000 mL (le volume est indiqué sur l'étiquette) et mélangée délicatement avant l'utilisation. Comme certains cristaux de sel peuvent être présents dans le flacon, prendre soin

de dissoudre tout le contenu lors de la préparation de la solution. Lors de la préparation, éviter la formation de mousse car la présence de bulles pourrait influencer l'efficacité des cycles de lavage.

Remarque : Une fois diluée, la solution de lavage est stable pendant 1 semaine à +2...8°C.

6. Conjugué :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

Veiller à ne pas contaminer le liquide avec des produits chimiques oxydants, de la poussière entraînée par l'air ou des microbes. Si ce composant doit être transféré, n'utiliser que des récipients jetables en plastique, si possible stériles.

7. Substrat TMB :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

Éviter la contamination du liquide avec des produits chimiques oxydants, de la poussière entraînée par l'air ou des microbes. Ne pas exposer à un fort éclairage à des agents oxydants et à des surfaces métalliques. Si ce composant doit être transféré, n'utiliser que des récipients jetables en plastique, si possible stériles.

8. Diluant de Dosage :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

9. Solution d'Arrêt:

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

10. Diluant pour échantillon :

Prêt à l'emploi. Agiter correctement le vortex avant utilisation.

I. INSTRUMENTS ET ACCESSOIRES UTILISÉS AVEC LA TROUSSE

1. Les micropipettes doivent être calibrées pour délivrer le volume correct nécessaire pour le test et doivent être soumises à une décontamination régulière (alcool ménager, solution à 10% d'eau de javel, désinfectants de qualité hospitalière) de ces pièces qui pourraient accidentellement entrer en contact avec l'échantillon ou les composants du kit. Elles doivent également être régulièrement entretenues afin de fournir une précision de 1% et une exactitude de $\pm 2\%$. La décontamination des fuites ou des résidus de composants du kit devrait également être effectuée régulièrement.
2. L'incubateur ELISA doit être réglé à +37°C (tolérance de $\pm 0,5^\circ\text{C}$) et vérifié régulièrement pour assurer le maintien d'une bonne température. Les deux incubateurs à sec et des bains d'eau sont appropriés pour les incubations, à condition que l'instrument soit homologué pour l'incubation des tests ELISA.
3. Le laveur ELISA est extrêmement important pour les performances globales du test. Le laveur doit être soigneusement homologué et correctement optimisé. Habituellement 4-5 cycles de lavage (+ dispense d'aspiration de la solution de lavage 350 µL/puits = 1 cycle) sont suffisants pour faire en sorte que l'essai fonctionne comme prévu. Un temps de trempage de 20-30 secondes entre les cycles est proposé. Afin de régler correctement leur nombre, il est recommandé d'exécuter un test avec les contrôles du kit/calibrateur et des échantillons de référence négatifs

et positifs bien caractérisés, et de vérifier qu'ils correspondent aux valeurs indiquées ci-dessous dans les sections O "Contrôle de Qualité Interne". L'étalonnage régulier des volumes délivrés et entretien (décontamination et nettoyage des aiguilles) du laveur doit être effectué selon les instructions du fabricant.

4. Les temps d'incubation ont une tolérance de $\pm 5\%$.
 - ✓ Méthode à courte incubation (pour la 1^{ère} / 2^{ème} incubation, tolérance entre 43 min à 47 min ; pour la 3^{ème} incubation, tolérance entre 14 et 16 min).
 - ✓ Méthode incubation standard (pour la 1^{ère} incubation tolérance entre 57 et 63 minutes, pour la 2^{ème} et la 3^{ème} incubation, tolérance entre 29 et 31 minutes).
5. Le lecteur de plaques microtitre ELISA doit être équipé d'un filtre de lecture de 450 nm et de préférence d'un second filtre (620-630nm) à des fins d'interception. Ses performances standard doivent être (a) bande passante ≤ 10 nm; (b) gamme d'absorbance de 0 à $\geq 2,0$; (c) linéarité $\geq 2,0$; répétabilité $\geq 1\%$. L'interception est effectuée sur le bien identifié dans la section « Procédure de test ». Le système optique du lecteur doit être étalonné périodiquement pour garantir que la densité optique correcte est mesurée. Il doit être entretenu régulièrement conformément aux instructions du fabricant.
6. Lors de l'utilisation d'une station de travail ELISA automatisée, toutes les étapes critiques (dispense, incubation, lavage, lecture, agitation, traitement des données) doivent être soigneusement réglées, calibrées, contrôlées et entretenues régulièrement afin de correspondre aux valeurs indiquées dans les sections O "Contrôle de Qualité Interne". Le protocole de dosage doit être installé dans le système d'exploitation de l'unité et validé pour le laveur et le lecteur. En outre, la partie de traitement des liquides de la station (dispensation et lavage) doit être validée et correctement configurée. Une attention particulière doit être accordée afin d'éviter de conserver les aiguilles usagées pour la dispense et le lavage. Cela doit être étudié et contrôlé pour minimiser la possibilité de contamination des puits adjacents en raison des échantillons fortement réactifs, conduisant à des résultats faussement positifs. L'utilisation de postes de travail automatisés ELISA est recommandée pour le dépistage du sang et lorsque le nombre d'échantillons à tester dépasse 20-30 unités par opération.

L. CONTRÔLES ET PROCÉDURES PRÉALABLES AU TEST

1. Vérifier la date de péremption du kit imprimée sur l'étiquette extérieure de l'emballage. Ne pas utiliser si la date est dépassée.
2. Vérifier que les composants liquides ne sont pas contaminés par des particules ou agglomérats visibles à l'œil nu. Vérifier que le substrat TMB est incolore ou bleu pâle en aspirant une petite quantité avec une pipette en plastique transparente stérile. S'assurer qu'aucun bris ne s'est produit au cours du transport et qu'aucun débordement de liquide ne se trouve à l'intérieur de la boîte. Vérifier que le sachet

en aluminium, contenant la plaque microtitre, n'est pas percé ou endommagé.

3. Diluer tout le contenu du tampon de lavage concentré 20x comme décrit ci-dessus.
4. Dissoudre le calibre de la façon décrite ci-dessus.
5. Laisser tous les autres composants atteindre la température ambiante (environ 1 heure), puis mélanger comme décrit.
6. Régler l'incubateur ELISA à $+37^{\circ}\text{C}$ et préparer le laveur ELISA en l'amorçant avec la solution de lavage diluée, d'après les instructions du fabricant. Définir le bon nombre de cycles de lavage indiqué en section I.3
7. Vérifier que le lecteur ELISA a été réglé au moins à 20 minutes avant de lire.
8. En cas d'utilisation d'un poste de travail automatisé, l'allumer, vérifier les paramètres et s'assurer d'utiliser le protocole de dosage exact.
9. Vérifier que les micropipettes sont réglées au volume requis.
10. Vérifier que tous les autres équipements sont disponibles et prêts à utiliser.
11. En cas de problèmes, ne pas poursuivre le test et informer le superviseur.

M. PROCÉDURE DE TEST

Le test doit être effectué conformément aux indications ci-dessous, en prenant soin de conserver le même temps d'incubation pour tous les échantillons testés.

La procédure d'analyse peut être effectuée en exécutant deux fois les procédures d'incubation. Sélectionner la méthode correspondant au règlement local :

1. Incubation Standard (1^{ère} incubation 60 minutes, 2^{ème} et 3^{ème} incubation 30 minutes)
2. Incubation Courte (1^{ère} et 2^{ème} incubation 45 minutes, 3^{ème} incubation 15 minutes)

1. Incubation Standard - Dosage manuel :

1. Placer le nombre requis de micro-puits dans le support. Laissez le 1^{er} puits vide pour l'opération de suppression.
2. Distribuer 200 μL de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200 μL Calibrateur en double et 200 μL Contrôle Positif en unique dans les puits appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi !
3. Ajouter 200 μL de Diluant pour Échantillon dans tous les puits, puis distribuer 10 μL d'échantillon dans chacun correctement identifié. Mélanger doucement la plaque, en évitant le débordement et la contamination des puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

Remarque importante: Contrôler que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'ajout de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, en contrôlant que l'échantillon a bien été ajouté.

4. Distribuer 50 μL de Diluant de Dosage dans tous les contrôles/étalon et puits d'échantillon. Vérifier que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la plaque microtitre pendant **60 min à 37°C** .
Note importante : Les bandes doivent être scellées avec la feuille d'étanchéité adhésive fournie, que lorsque le test est effectué manuellement. Ne couvrez

pas les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.

6. Laver la plaque microtitre avec un laveur automatique en distribuant et aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme décrit précédemment (section I.3).
7. Pipeter 100 µL de conjugué enzymatique dans chaque puits, sauf les premier et second puits réservés à la soustraction des blancs et couvrir avec la feuille adhésive. S'assurer que ce réactif de couleur rouge a été distribué dans tous les puits, sauf A1.

Remarque importante: Veiller à ne pas toucher la surface intérieure du plastique du puits avec le conjugué enzymatique. Une contamination pourrait se produire.

8. Incuber la plaque microtitre pendant **30 min à 37°C**.
9. Laver les puits comme indiqué en section I.3.
10. Introduire à la pipette 100 µL mélange de Substrat TMB dans chaque puits, puits vide inclus. Puis incuber la plaque microtitre à température ambiante (18-24°C) pendant **30 minutes**.

Remarque importante: Ne pas exposer à un fort éclairage direct. Un fort fond pourrait être généré.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme à l'étape 10 pour arrêter la réaction enzymatique. L'addition d'une solution d'arrêt fera passer le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit en section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et si possible à 620-630nm (soustraction de fond), en obturant l'instrument sur A1.

Remarques importantes:

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, s'assurer qu'aucune empreinte digitale n'est présente sur le fond du puits avant lecture à 450 nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.
2. La lecture devrait idéalement être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, mais jamais plus de 20 minutes après. Une auto-oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.
3. Il a été démontré qu'une agitation à 350 ± 150 tours par minute pendant l'incubation augmentait la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

2. Incubation Courte- Dosage manuel:

1. Placer le nombre requis de micro-puits dans le support. Laisser le 1^{er} puits vide pour l'opération d'obturation.
2. Distribuer 200 µL de Contrôle Négatif, en trois exemplaires, 200 µL Calibrateur en double et 200 µL de Contrôle Positif en simple dans les puits appropriés. Ne pas diluer les contrôles et l'étalon car ils sont pré-dilués, prêt à l'emploi !
3. Ajouter 200 µL de Diluant pour Échantillon dans tous les puits d'échantillon; puis distribuer 10 µL d'échantillon dans chaque puits correctement

identifié. Mélanger doucement la plaque, en évitant le débordement et la contamination des puits adjacents, afin de disperser complètement l'échantillon dans son diluant.

Remarque importante: Contrôler que la couleur du diluant de l'échantillon, lors de l'addition de l'échantillon, passe du vert clair au vert bleuâtre foncé, en vérifiant que l'échantillon a bien été ajouté.

4. Distribuer 50 µL Diluant de Dosage dans tous les puits de contrôles/étalons et d'échantillon. Vérifier que la couleur des échantillons a tourné au bleu foncé.
5. Incuber la plaque microtitre pendant **45 min à 37°C**. Remarque importante : Les bandes doivent être scellées avec la feuille d'étanchéité adhésive fournie uniquement lorsque le test est effectué manuellement. Ne pas couvrir les bandes lors de l'utilisation des instruments automatiques ELISA.
6. Laver la microplaque avec un laveur automatique en fournissant et en aspirant 350 µL/puits de solution de lavage diluée comme indiqué à la section I.3.
7. Introduire à la pipette 100 µL de Conjugué Enzymatique dans chaque puits, sauf le 1^{er} puits d'obturation, et couvrir avec le scellant. Vérifiez que ce composant de couleur rouge a été distribué dans tous les puits, sauf A1.

Remarque importante: Veiller à ne pas toucher la surface intérieure en plastique du puits avec l'embout rempli de conjugué enzymatique. Une contamination pourrait se produire.

8. Incuber la plaque microtitre pendant **45 min à +37°C**.
9. Laver les micro-puits comme indiqué en section I.3.
10. Pipeter 100 µL de mélange de Substrat TMB dans chaque puits, puits blanc inclus. Puis incuber la plaque microtitre à température ambiante (18-24°C) pendant **15 minutes**.

Remarque importante: Ne pas exposer à un fort éclairage direct. Un fond élevé pourrait être généré.

11. Pipeter 100 µL de Solution d'Arrêt dans tous les puits à l'aide de la même séquence de pipetage comme au point 10 pour arrêter la réaction enzymatique. L'addition d'une solution d'arrêt fera passer le contrôle positif et les échantillons positifs du bleu au jaune.
12. Mesurer l'intensité de la couleur de la solution dans chaque puits, comme décrit en section I.5, au filtre de 450nm (lecture) et si possible à 620-630nm (soustraction de fond), en obturant l'instrument sur A1.

Remarques importantes :

1. Si le deuxième filtre n'est pas disponible, s'assurer qu'aucune empreinte digitale n'est présente sur le fond du puits avant lecture à 450 nm. Les empreintes digitales pourraient générer des résultats faussement positifs sur la lecture.
2. La lecture devrait idéalement être effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt, et jamais plus de 20 minutes après. Une auto-

oxydation du substrat peut se produire conduisant à un fond supérieur.

3. Il a été démontré qu'une agitation à 350 ± 150 tours par minute pendant l'incubation augmentait la sensibilité de l'essai d'environ 20%.

N. SCHÉMA DU TEST

Méthode	Opérations (Incubation Standard)	Opérations (Incubation Courte)
Étalons et Calibrateur	200 µL	200 µL
Diluant de l'Échantillon et Échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon	200 µL diluant + 10 µL échantillon
Diluant de Dosage	50 µL	50 µL
1^{ère} incubation	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Conjugué Enzymatique	100 µL	100 µL
2^{ème} incubation	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Température	+37°C	+37°C
Étape de lavage	4-5 cycles	4-5 cycles
Substrat TMB	100 µL	100 µL
3^{ème} incubation	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Température	Température ambiante (18...24°C)	Température ambiante (18...24°C)
Solution d'Arrêt	100 µL	100 µL
Lecture DO	450/620nm	450/620nm

Un exemple de système de dispense est indiqué ci-dessous (valable pour les deux procédures de temps d'incubation) :

Plaque microtitre

	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										

Légende : BLK = Blanc NC = Contrôle Négatif
CAL = Calibrateur PC = Contrôle Positif S = Échantillon

O. CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Un contrôle est effectué sur les contrôles et le calibrateur une fois que le kit est utilisé afin de vérifier si leurs valeurs sont OD450/620nm comme prévu et reportés dans le tableau ci-dessous.

Vérifier	Condition exigée
Puits blanc	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm < 0,100
Contrôle Négatif (NC)	<0,050 signifie OD450/620nm après suppression
Calibrateur	S/Co >1.1
Contrôle Positif	Valeur de la DO à 450 nm/620 nm >1.000

Si les résultats de l'essai correspondent aux exigences énoncées ci-dessus, passer à la section suivante. Sinon, ne pas aller plus loin et effectuer les contrôles suivants :

Problème	Vérifier
Puits blanc DO à 450 nm > 0,100	1. que la solution de substrat n'a pas été contaminée au cours de l'essai
Contrôle Négatif (NC) DO à 450 nm après suppression > 0.050	1. Que la procédure de lavage et les paramètres de lavage sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 2. Que la solution de lavage appropriée a été utilisée et le laveur a été amorcé avec celle-ci avant l'utilisation ; 3. Qu'aucune erreur n'a été commise dans la procédure de test (dispense de contrôle positif au lieu du négatif) ; 4. Qu'aucune contamination du contrôle négatif ou des puits où le contrôle a été dispensé ne s'est produite en raison de déversements d'échantillons positifs ou du conjugué enzymatique ; 5. Les micropipettes n'ont pas été contaminées avec des échantillons positifs ou avec le conjugué enzymatique 6. que les aiguilles du laveur sont pas bloquées ou partiellement obstruées.
Calibrateur S/Co<1.1	1. Que la procédure a été effectuée correctement ; 2. Qu'aucune erreur s'est produite lors de la distribution (ex. : dispense de contrôle négatif à la place de l'étalon) 3. Que la procédure de lavage et les paramètres de lave sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 4. qu'aucune contamination externe du calibreur ne s'est produite.
Contrôle Positif DO à 450 nm <1.000	1. Que la procédure a été effectuée correctement ; 2. Qu'aucune erreur ne s'est produite lors de la distribution de la commande (dispense de contrôle négatif à la place du contrôle positif. Dans ce cas, le contrôle négatif aura une valeur d'OD450nm> 0,150, aussi. 3. Que la procédure de lavage et les paramètres de lavage sont validés comme dans l'étude de pré-qualification ; 4. qu'aucune contamination externe du contrôle positif n'a eu lieu.

Si l'un des problèmes ci-dessus a eu lieu, signaler le problème au superviseur pour les actions à mener.

P. RÉSULTATS

Les résultats des tests sont calculés au moyen d'une valeur seuil déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC soit} + 0.350$$

La valeur trouvée pour le test est utilisée pour l'interprétation des résultats de la manière décrite au paragraphe suivant.

Q. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats des tests sont interprétés en tant que rapport de l'échantillon OD450nm et de la valeur Cut-Off (ou S/Co) selon le tableau suivant :

S/Co	Interpretation
< 0.9	Négatif
0.9 - 1.1	Équivoque
> 1.1	Positif

Un résultat négatif indique que le patient n'a pas été contaminé par le HCV ou que l'unité de sang peut être transfusée. Tout patient présentant un résultat équivoque devrait être dépisté à nouveau sur un deuxième échantillon prélevé 1-2 semaines plus tard et examiné. L'unité de sang ne doit pas être transfusée.

Un résultat positif indique une infection par le HCV ; le patient doit donc être traité en conséquence ou l'unité de sang doit être jetée.

Remarques importantes:

1. *L'interprétation des résultats doit se faire sous la supervision du responsable du laboratoire pour réduire le risque d'erreurs de jugement et de mauvaises interprétations.*
2. *Tout résultat positif doit être confirmé par une méthode alternative capable de détecter les anticorps IgG et IgM (test de confirmation) avant que le diagnostic de l'hépatite virale soit formulé.*
3. *Comme l'a montré l'évaluation de la performance du produit, le dosage est capable de détecter la séroconversion anticorps anti-HCV de base **plus tôt** que d'autres kits commerciaux. Par conséquent, un résultat positif, non confirmé avec ces kits commerciaux, ne doit pas être écarté à titre de faux résultat positif ! L'échantillon doit être de toute façon soumis à un test de confirmation.*
4. *Tant que le test est capable de détecter aussi des anticorps IgM, des résultats discordants avec les autres produits du commerce pour la détection des anticorps anti -HCV - à défaut d'anti-hIgM conjugué dans la formulation du traceur enzymatique et donc dépourvus de réactivité IgM - peuvent être présents. La vraie positivité de l'échantillon pour les anticorps anti-HCV doit être ensuite confirmée par l'examen aussi de la réactivité IgM, important pour le diagnostic de l'infection par le HCV.*
5. *Lorsque les résultats des tests sont transmis par le laboratoire à un centre informatique, il faut veiller à éviter le transfert de données erronées.*
6. *Le diagnostic de l'infection virale de l'hépatite doit être fait et remis au patient exclusivement par un médecin qualifié.*

Un exemple de calcul est rapporté ci-dessous :

Les données suivantes ne doivent pas être utilisées à la place des chiffres réels obtenus par l'utilisateur.

Contrôle Négatif : 0.019 - 0,020 à 0,021 OD450nm

Valeur Moyenne : 0,020 à 0,050 OD450nm Basse - Accepté

Contrôle positif : 2.189 OD450nm

Supérieur à 1.000 - Accepté

Cut-Off = 0,020 0,350 = 0,370

Calibrateur : 0,550 à 0,530 OD450nm

Valeur Moyenne : 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S / Co supérieures à 1,1 - Accepté

Échantillon 1 : 0,070 OD450nm

Échantillon 2 : 1.690 OD450nm

Échantillon 1 S / Co <0,9 = négatif

Échantillon 2 S / Co > 1.1 = positif

R. PERFORMANCES

L'évaluation de la performance a été réalisée conformément aux spécifications techniques communes ou CTS (art. 5, chapitre 3 de la directive IVD 98/79/CE) et aux deux procédures d'incubation (standard et courts).

1. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection du test a été calculée en utilisant le test d'incubation court selon la norme de travail britannique anti-HCV, NIBSC code 06/188-006. Le tableau ci-dessous indique les valeurs moyennes OD450nm de cette norme lorsque dilué dans le plasma négatif, puis examiné.

Dilution	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	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
Plasma Négative	0,25	0,20	0,20

En outre, l'échantillon codé Accurun 1 - série 3000 - fourni par Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, a été évaluée "en totalité, donnant les résultats ci-dessous:

Accurun 1 série	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Facteur	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SPÉCIFICITÉ ET SENSIBILITÉ DIAGNOSTIQUE

L'évaluation de la performance de l'appareil a été réalisée dans un essai mené sur plus de 5000 échantillons au total.

2.1 Spécificité Diagnostique

Elle est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat négatif en l'absence d'un analyte spécifique. Un total de plus de 5000 donateurs non sélectionnés, y compris les primo-donneurs, ont été examinés.

La spécificité diagnostique a été évaluée contre un kit US approuvé par la FDA.

5043 donneurs de sang ont été testés en fournissant une spécificité de 99,5%. 210 patients hospitalisés ont été dépistés pour le HCV Ab; une spécificité diagnostique de 99,5% a été constatée. En outre, la spécificité du diagnostic a été évaluée en testant 162 échantillons potentiellement interférents (autres maladies infectieuses, anticorps E. coli positif, patients atteints de maladies non virales hépatiques, patients dialysés, femmes enceintes, hémolysés, lipémiques, etc.) Une valeur de spécificité de 100% a été évaluée.

Aucune fausse réactivité due à la méthode de préparation des échantillons n'a été observée. Le plasma, dérivé avec des techniques de préparation (citrate, EDTA et héparine), et les sérums standards différents ont été utilisés pour déterminer la valeur de la spécificité. Les échantillons congelés ont été testés, ainsi, de vérifier les interférences dues à la collecte et au stockage. Aucune interférence n'a été observée.

2.2 Sensibilité Diagnostique

Elle est définie comme la probabilité d'obtenir d'un résultat positif en présence d'un analyte spécifique. La sensibilité diagnostique a été évaluée à l'extérieur sur un nombre total de 348 échantillons; une sensibilité diagnostique de 100% a été constatée. En interne, plus de 50 autres échantillons positifs ont été testés, en fournissant une valeur de sensibilité diagnostique d'encore 100 %. Les échantillons positifs des infections réalisés selon différents génotypes du HCV ont été également testés.

De plus, la plupart des panels de séroconversion venant de chez Boston Biomedica Inc., Etats-Unis, (PHV) et Zeptometrix, Etats-Unis, (HCV) ont été étudiés.

Les résultats sont rapportés ci-dessous pour quelques-uns d'entre eux.

Panneau	N° Échantillon	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

Remarque:

1. Échantillons positifs détectés

2. HCV v.3.0

Enfin, le produit a été testé sur le panneau EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, fourni par l'Etablissement Français du Sang (EFS), la France, avec les résultats suivants:

EFS Panel Ac HCV

Échantillon	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Valeur Moyenne
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Négative
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positive
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positive
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positive
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positive
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positive

3. PRECISION

Elle a été calculée sur cinq échantillons, un négatif et quatre positifs examinés dans 4 répliques dans chacune des six séries distinctes. La précision obtenue pour les deux protocoles, est équivalente.

Les résultats sont indiqués ci-après :

Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit – 1^{er} Lot (test d'incubation court)

Échantillon	S/Co Moyenne	Précision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.03	6.66	10.56	12.48
Positifs	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

Résultats intra-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1^{er} lot (test d'incubation longue)

Échantillon	S/Co Moyenne	Precision - %CV		
		Intra Essai	Inter Essai	Total
Négatif	0.04	4.67	12.34	13.19
Positifs	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

Résultats inter-lot : EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} Lot (test d'incubation courte)

Échantillon	Precision - %CV		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Négatif	8,65	8,29	6,13
Calibrateur	4,98	4,44	5,38
Positif	4,11	3,11	1,37

La variabilité indiquée dans les tableaux ci-dessus n'a pas abouti à une classification erronée de l'échantillon.

S. SUGGESTIONS DE SOLUTION

Le respect de la procédure de test et les spécifications, ainsi que d'une bonne utilisation de réactifs et de pipetage correct, peut aider à éviter les types d'erreurs suivantes :

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
OD très différent ($\pm 50\%$) de la DO rapportée sur QC	<ul style="list-style-type: none"> - Volume incorrect de distribution de réactifs (suggestion : vérifier la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai ; calibrer à nouveau les pipettes) - Température incorrecte ou mauvais temps d'incubation (suggestion : plus de soin dans le maintien de l'incubateur ; noter le début de l'incubation) - Erreur dans le lavage ou la lecture du photomètre (suggestion : vérifier le fonctionnement ou les paramètres des instruments respectifs) - Contamination de substrat ou conjugué (suggestion :: utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres)
Faibles résultats reproductibles	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de volume constant de distribution d'échantillons ou de réactifs (suggestion : vérifier la précision des pipettes et la correspondance entre le volume distribué par la pipette et celui requis par l'essai ; calibrer à nouveau les pipettes) - Erreur dans le lavage ou en lecture (suggestion : vérifier le fonctionnement ou les paramètres des instruments respectifs) - Contamination de substrat (suggestion : utiliser uniquement des contenants de plastique jetables et propres) - La pollution ou la dégradation des réactifs (suggestion : utiliser des conseils appropriés, jetables et des contenants de plastique propres pour réactifs et de haute qualité l'eau distillée ou équivalent)
Aucune réaction colorimétrique Après addition du substrat	<ul style="list-style-type: none"> - Réactif non pipeté - Forte contamination du conjugué et du substrat - Erreurs dans l'exécution de la procédure d'essai (par exemple de pipetage accidentelle de réactifs dans une mauvaise séquence ou d'un mauvais flacon, etc.)
trop faible réaction (trop faible DO)	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'incubation trop court, température d'incubation trop faible - Incorrecte dilution du conjugué
Trop grande réaction (DO trop élevé) – incorrecte dilution du conjugué	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée - Qualité de l'eau pour le tampon de lavage insuffisante (bas degré de désionisation) - Lavage insuffisant (conjugué non correctement supprimé)
observations aberrantes	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination des pipettes, des embouts ou des conteneurs - Lavage inconstant et insuffisant (conjugué non correctement éliminé)

ERREUR	CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
CV% intra-série trop élevé	<ul style="list-style-type: none"> - Réactifs et/ou bandes non préchauffé(e)s à la température ambiante avant de les utiliser - Le plateau du laveur ne lave pas correctement (suggestion: nettoyer la tête du laveur)
CV% trop élevé entre les séries	<ul style="list-style-type: none"> - Conditions d'incubation non constantes (temps, température) - Contrôles et échantillons non distribués en même temps (aux mêmes intervalles) (vérifier ordre de pipetage) - Variation liées à la personne

T. AUTOMATISATION

Les procédures définies dans ces instructions d'utilisation s'appliquent aux tests manuels seulement. Lors de l'utilisation d'instruments automatisés, suivre les procédures qui figurent dans le manuel de l'opérateur fourni par le fabricant de l'appareil. Les laboratoires doivent suivre leurs procédures de validation approuvées pour démontrer la compatibilité de ce produit sur des systèmes automatisés.

U. LIMITATIONS

Des résultats faux positifs répétables, non confirmés par RIBA ou des techniques de confirmation similaires, ont été évalués comme inférieurs à 0,1% de la population normale.

Il a été observé que des échantillons congelés contenant des particules ou agrégats de fibrine après décongélation généraient des résultats erronés.

REFERENCES

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

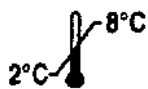
Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Ezt a használati utasítást figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően.
A tesztek megbízhatósága nem garantált, ha ezen használati utasításokban foglaltaktól bármiben eltérnek.



Gyártó:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

hu

A CÍMKÉKEN HASZNÁLT JELZÉSEK

Magyar HU							
	In Vitro Diagnosztikum	Katalógusban Szereplő Kód	Lot Szám	Figyelem, olvassa el a felhasználói útmutatót.	Hőmérséklet határok	Lejárat Idő	Vizsgálatok Száma
	Gyártó	Óvja a Napfénytől	Gyártás Időpontja	Mikroplate	Pozitív kontroll	Negatív kontroll	Kalibrátor
	Konjugátum	Minta hígító	Szubsztrát TMB	Stop oldat (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Mosópuffer Koncentrátum 20x	Próbahígító	Rekonsztáló x mL
	Biológiai kockázat	Veszély	Figyelem				

Figyelem!

A stop oldat osztályozása: Skin corr. 1A



- **Figyelmeztetés:**
Veszély
- **A címkézés veszélyt meghatározó összetevői:**
Kénsav
- **Figyelmeztető mondatok:**
H314 Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz.
- **Óvintézkedésre vonatkozó mondatok:**
P260 A por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzése tilos.
P303+P361+P353 HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: Az összes szennyezett ruhadarabot azonnal el kell távolítani/le kell vetni. A bőrt le kell öblíteni vízzel/zuhanyozás.
P305+P351+P338 SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.
P310 Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.
P405 Elzárva tárolandó.
P501 Az edény tartalmát/a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

Figyelem!

A pozitív kontroll, a negatív kontroll, a kalibráló, a Konjugátum, a Minta hígító, a Minta hígító Mosópuffer Koncentrátum 20x osztályozása: Skin sens. 1



- **Figyelmeztetés:**
Figyelem
- **A címkézés veszélyt meghatározó összetevői:**
Keverék: 5-klór-2-metil-2H-izotiazolin-3-on [EC sz. 247-500-7]; 2-metil-2H-izotiazolin-3-on [EC sz. 220-239-6] (3:1)
- **Figyelmeztető mondatok:**
H317 Allergiás bőrreakciót válthat ki.
- **Óvintézkedésre vonatkozó mondatok:**
P261 Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését.
P280 Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező..
P321 Különleges kezelés (lásd ezen a címkén).
P333+P313 Bőr érzékenység vagy repedés esetén: forduljon orvoshoz.
P302+P352 BŐRRE KERÜLÉSE ESETÉN: öblítse le bő vízzel.
P501 Az edény tartalmát/a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

A biztonsági kártyákra vonatkozó adatok a www.adaltis.net található.

A. HASZNÁLATI CÉL

Negyedik generációs, immunenzim teszt (ELISA) C hepatitisz antivírus antitestek humán plazmákban (EDTA, heparin és citrát) és szérumokban történő in vitro diagnosztikai kimutatására. HCV vírussal fertőzött páciensektől begyűjtött vérben levő antitestek meghatározására használható készlet.

Ez a kit in vitro diagnosztikai használatra alkalmas.

B. BEVEZETÉS

Az Egészségügyi Világszervezet (OMS) C hepatitisz vírus fertőzést a következőképpen határozza meg:

„ A C hepatitisz a máj vírusos megbetegése, „nem A, nem B” hepatitiszként is számontartva, parenterálisan továbbítottan, az okozó ágens beazonosításáig 1989-ben. A C hepatitisz vírus felfedezése és jellemzése elvezet a poszt-transzfúziós hepatitiszek elsődleges szerepének és a perzisztencia fertőzések kiváltásában játszott irányultsága megértéséhez”.

A HCV alapvetően az emberi vérrrel való érintkezés útján terjed. Világszerte a HCV alapvető okai a transfúziókhöz használt, a nem ellenőrzött vér és a nem megfelelően sterilizált tűk és fecskendők újrafelhasználása.

Jelenleg nincs védőoltás a C hepatitisz megelőzésre, a krónikus C hepatitisz kezelése túlságosan költséges ahhoz, hogy a fejlődő országok népessége felhasználhassa. Ennél fogva, globálisan tekintve, a C hepatitiszes betegekre tett legnagyobb hatás a HCV mozokomiális (vér transfúziók, nem biztonságos injekciók) transzmisszió kockázatok és nagy kockázatú magatartás (drog injekció) csökkentésére irányuló erőfeszítésekkel érhető el.

A C hepatitisz (HCV) vírus olyan vírus (A, B, C, D és E), ami az esetek többségében a vírusos hepatitiszért tehető felelőssé. Ez egy, a flaviviridae családból származó, monokatenáris RNS vírus korlátozott gazdasejt spektrummal rendelkezve. Kizárólag az emberek és a csimpánzok vannak kitéve a fertőzés veszélyének, és mindkét esetben azonos betegség alakul ki. A vírus lényeges jellemzője a relatív genom változékonyság, ami valószínű, a krónikus fertőzések kialakítási tendenciához (80%) kapcsolódik. A HCV különféle egyesül genotípusokkal, amelyek jelentősen meghatározhatják a betegség súlyosságát és a kezelésre való választ.

A HCV fertőzés lappangási ideje a klinikai szimptómák megjelenése előtt 15 és 150 nap közötti. Az akut szimptómák között a gyakoribbak a fáradtságérzet és a sárgaság, mindenképpen, az esetek többségében (60% és 70%), azok is, amelyek krónikus fertőzést mutatnak, aszimptotikusak. Az új, fertőzött betegek körülbelül 80% - krónikus fertőzött. A krónikus fertőzöttek 10 %-a és 20%-a cirrózis, ugyanakkor 20- 30 év közötti időtartam alatt, a krónikus fertőzöttek 1%-ában és 5%-ában fordul elő májdaganatos megbetegedés. A májdaganatos betegek többsége, akik nem B hepatitisz fertőzöttek, HCV vírus fertőzöttek. Még nem tisztázott a HCV vírus fertőzés májdaganat okozó mechanizmus. A C hepatitisz súlyosbítja a májbetegségeket egyéb hepatitisz

problémák esetén. Pontosabban, a májbetegség azon hepatitisz betegek esetén alakul ki gyorsabban, akik túlzott alkoholfogyasztók és HCV vírus fertőzöttek. A HCV vírus alapvetően a fertőzött vérrrel való kontaktussal terjed. A transzmisszió a HCV vírus jelenlétének tesztelésére használt szerológiai nem kontrollált vértranszfúzió révén újrafelhasznált fecskendőtü, fecskendő és egyéb, nem megfelelően sterilizált, orvosi eszközök révén, vagy a droghasználók közötti fecskendőtü csere révén jól dokumentált. A transzmisszió bekövetkezhet nemi vagy perinatális úton, azonban ez ritkán fordul elő. Egyéb, transzmisszió módok nem a megfelelően sterilizált eszközök használata esetén, viselkedési, társadalmi, kulturális szokásokhoz (body piercing, körülmelés és tetoválás) kapcsolódnak. A HCV nem terjed tüsszentés, testi érintkezés, köhögés, étel, víz, evőeszköz vagy ivóeszköz megosztás, vagy alkalmoszerű érintkezés esetén.

Úgy a fejlett országokban, mint a fejlődő országokban a nagy kockázatú csoportokba a befecskendezhető drogok használói, a szerológiailag nem kontrollált vér befogadók, a hemofiliás, a dialízises és védekezés nélkül kockázatos nemi életet folytató tartoznak. A becslések szerint a fejlett országokban a krónikus HCV vírus fertőzött betegek 90%-a alapvetően az injekciós droghasználók és a szerológiailag nem kontrollált vért vagy vérkészítményt kapott személyek. A fejlődő országok többségében, ahol még mindig használatban van szerológiailag nem kontrollált vér és vérkészítmény az alapvető transzmissziós eszközök a nem sterilizált injekciók és a szerológiailag nem ellenőrzött vértranszfúzió. Ugyanakkor az áldozati rítusokat és körülmelését gyakoroló személyek is kockázat csoportok, amennyiben nem sterilizált fém eszközöket használnak vagy újrafelhasználják azokat.

Az OMS becslése szerint körülbelül 170 millió személy, vagyis a világ népesség 3% -a HCV vírus fertőzött és ki van téve a cirrózis és/vagy májdaganat megbetegedés veszélyének. A HCV fertőzés túlsúlya sokkal nagyobb Afrikában, Közél-Keleten, Dél-Kelet Ázsiában és a Csendes óceán nyugati részén levő országokban mint Észak- Amerikában és Európában.

A HCV diagnosztikai tesztek a fertőzés megelőzésére szolgálnak a vér-, és vérplazma adók screening-je révén a klinikai diagnózis és a beteg megfelelő gyógyítására vonatkozó döntések meghatározása céljából. A jelenleg rendelkezésre álló, diagnosztikai tesztek a HCV, specifikus antitestek mérésére szolgáló immunenzim (EIA) adagoláson alapulnak. Az EIA rendszer a a krónikus fertőzött betegek több mint 95%-át és az akut fertőzöttek 50%-át és 70% -át képes mérni. HCV egyedi antigénnel reakcióba lépő antitestazonosító, rekombinációs immunoblot minta (RIBA) gyakran használt a pozitív EIA eredmény megerősítő, kiegészítő tesztek esetén. Szintén használatosak a RNS megerősítésen alapuló HCV tesztek (pl., PCR, kötött DNA minta) a szerológiai eredmény megerősítésére és a hatékony antivírus terápia megállapítására. A pozitív eredmény aktív fertőzés jelenlétét és a fertőzés kiterjedésének és/vagy krónikus májbetegségek kialakulásának lehetőségét bizonyítja.

A krónikus C hepatitiszes betegek kezelésére egyedi vagy ribavirin-nel kombinált interferon antivírus

gyógyszerek használhatók, annak ellenére, hogy a kezelés nagyon magas költségekkel jár. Az egyedi interferon kezelés a betegek körülbelül csak 10%- 20%-a esetén hatékony. Ribavirin-el kombinált interferon az esetek 30%- 50%-a esetén hatékony. A ribavirin nem hatékony egyedi adagolás esetén.

Nem áll rendelkezésre hatékony HCV elleni oltás. A kutatások az oltóanyag előállítását célozzák, de a HCV genom komplikációkat okoz az oltóanyag előállításában. A HCV vírus fertőzést követő immun-védelmi válasz hiánya hátráltatja az oltóanyag kutatást. Még azt sem ismerjük, hogy az immunrendszer képes-e a vírus kikerülésére.

Ugyanakkor, néhány kutatás bizonyította a HCV fertőzött betegek körében vírussemlegesítő antitestek jelenlétét. Oltóanyag hiányában szükség van az összes, fertőzésmegelőzési óvintézkedésre, (a) vér-, és szerv screening és tesztre; (b) vírus aktiválására a plazmákban és a származékokban; (c) az egészségügyi gyakorlatban a protokollok során fertőzés ellenőrző gyakorlat növelésére és fenntartására, úgy mint, az orvosi és fogászati eszközök megfelelő sterilizálására; (d) a közemberek és az egészségügyi személyzet közötti kapcsolat megváltoztatásának promoválására az injekciók túlzott használatának csökkentése és biztonságos injekciók használata révén; (e) a droghasználók és nagy kockázatú, szexuális életet folytató személyek kockázati faktorai csökkentésére.

A genom atrukturális alkotók esetén kódolja a nukleokapszid fehérjét és a víruskapszid glikoproteint, és a vírus replikációban és a fehérjefeldolgozásban érintett, funkcionális alkotókat. Úgy tűnik a nukleokapszid kódoló terület a világszerte a legkonzervatívabb a létrehozott izoláltak közül.

C. A TESZT ELVE

A microplate specifikus HCV antigénekkal fedettek, amelyek az immunológiailag domináns konzerválókat és determináns antigéneket (Core peptid, rekombináns NS3, NS4 és NS5 peptidek) kódoló „core” és „ns” területekből származnak.

A szilárd fázis előbb hígított mintával kezelt, és ha a HCV antitestek jelen vannak, a Stop antigénekhez kötődnek. A minta, összes, egyéb komponensei mosása után a második inkubáció során a HCV antitestek kötődése után IgG és IgM antitesteket észleltek a peroxidokkal (HRP) megkülönböztetett specifikus anti- IgG&M poliklónozási antitestekkel ellátott Konjugátum hozzáadása révén.

A szilárd bázisra befogott enzim a TMB szubsztrát keverékre reagálva, optikai jelzést generál, ami a mintában jelenlevő anti HCV antitestek mennyiségéhez aránylik. A cut-off érték lehetővé teszi a HCV antitestek pozitív és negatív eredményein az optikai denzitás értelmezését.

D. KOMPONENSEK

A kit tartalmaz reagenseket 96 teszthez (071067 kód), vagy 192 teszthez (071064 kód), vagy 480 teszthez (071068 kód).

Microplate	1
Negatív kontroll	1x4 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x2 mL/flakon
Kalibrátor	2 flakon
Konc. mosó oldat 20x	1x50 mL/flakon
Konjugátum	1x16 mL/flakon
Minta hígító	1x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	1x16 mL/flakon
Stop oldat	1x15 mL/flakon
Próbahígító	1x8 mL/flakon
Lemezborító lap	2
Tesztek száma	96
Kód	071067

Microplate	2
Negatív kontroll	2x4 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x4 mL/flakon
Kalibráló	3 flakon
Konc. mosó oldat 20x	2x50 mL/flakon
Konjugátum	2x16 mL/flakon
Minta hígító	2x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	2x16 mL/flakon
Stop oldat	2x15 mL/flakon
Próbahígító	2x8 mL/flakon
Plate Zárófóliák	4
Tesztek száma	192
Kód	071064

Microplate	5
Negatív kontroll	1x20 mL/flakon
Pozitív kontroll	1x10 mL/flakon
Kalibráló	7 flakon
Konc. mosó oldat 20x	5x50 mL/flakon
Konjugátum	2x40 mL/flakon
Minta hígító	5x50 mL/flakon
TMB szubsztrát	2x40 mL/flakon
Stop oldat	2x40 mL/flakon
Próbahígító	1x40 mL/flakon
Plate Zárófóliák	10
Tesztek száma	480
Kód	071068

1. Microplate

12 csík, 8 mikrocella Core peptiddel, amelyek bevontak NS3 peptid rekombinálóval, NS4 és NS5 peptidekkel. A plate-k alumínium tasakba vannak csomagolva deszikkánsal együtt.

Vigye a mikroplate-t szobahőmérsékletre (+18...24°C) a zacskó kinyitása előtt. A használatlan csíkokat vissza kell tenni a zacskóba, azt visszazárni és továbbra is +2...8°C között tárolni deszikkánsal együtt.

2. Negatív kontroll

Használatra kész kontroll. 10 mM, 6.0 ± 0.1, 2% Na-citrát oldat puffert, 2% alap proteint, 0.1% Proclin 150 kazeint tartalmaz mint tartósítószer. A negatív kontrollt olajzöld szín jelzi.

3. Pozitív kontroll

Használatra kész kontroll. Tartalmaz 1% kecske szérum fehérjét, pozitív humán HCV vírus antitesteket, 10 mM, pH 6.0±0.1, Na-citrát puffert, 0.5% Tween 20-ast, 0.09% Na-azidot, 0.1% Proclin 150-t mint tartósítószer. A pozitív kontrollt olajzöld szín jelzi.

Fontos megjegyzés: Élő patogének hiánya a pozitív kontrollban nem teljesen zárható ki, ezáltal a kontrollt

potenciálisan veszélyesként kell kezelni, a GLP-vel összhangban.

4. Kalibráló

Liofilizált kalibráló. A címkén jelzett EIA jelzésű vízmennyiségben kell feloldani. Tartalmaz magzati borjú szérumot, HCV vírusra pozitív humán antitesteket, 06/188-006 Munka szabvány NIBSC kód értelmében kalibrált tartalommal, 10mM, pH 6.0±0.1 Na-citrát puffert, 0.3 mg/mL szulfát gentamicin puffert és 0.1% Proclin 150 mint tartósítószer.

Fontos megjegyzés: Élő patogének hiánya a kalibrálóban nem teljesen zárható ki, ezáltal a reagenst potenciálisan veszélyesként kell kezelni, a GLP-vel összhangban.

Megjegyzések: a fiola tartalma feloldásához szükséges mennyiség tételenként változhat. Kérjük, használja a címkén jelzett, szabályos mennyiséget.

5. Koncentrált mosó oldat 20x

Koncentrált oldat 20x. Hígítás után a mosó oldat (hígított mosó puffer) 10 mM, pH 7.0 ± 0.2 foszfát puffert, 0.05% Tween 20-at és 0.05% Proclin 150-t tartalmaz mint tartósítószer.

Hígítás után a mosó oldat stabil marad 1 hétig 2 és 8°C közötti hőmérsékleten.

6. Konjugátum

Vörös színű, használatra kész és kódolt reagens. Tartalmaz humán IgG és IgM-el kecske poliklonozott antitestekkel peroxid-rafánt, 5% BSA-t, 10 mM, pH 6.4 ± 0.1 citrát puffert, 0.1% Proclin és 0.05% Tween 20-at mint tartósítószer.

7. TMB szubsztrát

Használatra kész komponens. Tartalmaz 50 mM, pH 3.5-3.8 citrát-foszfát puffert, 4% dimetil-szulfátot, 0.03% tetrametil-benzidint (TMB) és 0.02% hidrogén peroxidot (H₂O₂). Használat előtt enyhén felrázandó.

Megjegyzés: Fénytől védve tárolandó mivel erős sugárzásra érzékeny.

8. Minta hígító

Használatra kész komponens. Kecské szérumot, Tris 10mM, pH 8.0±0.1 tamponált oldatot tartalmaz, ami 0.1% Proclin 150-t és 0.09% Na-azidot tartalmaz minta előkezelés és lemez kontroll céljából, interferencia blokkolással.

9. Stop oldat

Használatra kész komponens.

0.3 M H₂SO₄ oldatot tartalmaz. Használat előtt enyhén felrázandó.

10. Próba hígító

Zöld színű, használatra kész és kódolt komponens. Tartalmaz 1% kazeint, 10 mM, pH 6.0 ± 0.1 Na-citrát puffert és 0.1% Proclin 150-t mint tartósítószer.

Megjegyzés: a hígító a próba jelenlétében olajzöld színről sötét kékeszöld színre vált.

E. SZÜKSÉGES, DE A KIT ÁLTAL NEM TARTALMAZOTT ANYAGOK

1. Kalibrált mikropipetták 200 µL és 10 µL és eldobható műanyag hegyek.
2. EIA szintű víz (duplán desztillált vagy deionizált, szén kezelt fertőtlenítőként használt oxidáló vegyületek eltávolítására).
3. Mérőóra 60 perces vagy hosszabb tartománnyal.
4. Absorbens papírtörölők.
5. Kalibrált ELISA mikroplate termosztatikus inkubátor (száraz vagy nedves) beállítva +37°C-nál.
6. Kalibrált ELISA mikroszűrő reader 450 nm (leolvasás) és ha lehetséges a fehér szín érzékelésére való, 620-630nm filterekkel.
7. Kalibrált ELISA mikroplate mosó.
8. Vortex vagy hasonló keverő eszközök.

F. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ELŐVIGYÁZATOSSÁG

1. A kitet képzett és megfelelően betanított személyzet használhatja csak a laboratóriumért felelős orvos felügyelete alatt. Ezt a használati útmutatót figyelmesen el kell olvasni a termék használatát megelőzően és szigorúan tartsa be a jelenlevő utasításokat.
2. A termék használata előtt olvassa el figyelmesen a biztonsági adatlapot (SDS).
3. Véregység és vérkészítmény screening-re való használat esetén a kitet ezen terület nemzeti hatósága (Eü. Minisztérium vagy hasonló hatóság) által bizonylatolt és minősített laboratóriumban kell használni ezen típusú vizsgálat kivitelezéséhez.
4. A teszt kivitelezésében részt vevő személyzetnek laboratóriumi védőruhát, por-mentes kesztyűt és szemüveget kell viselnie. El kell kerülni éles/hegyes (tűk) vagy vágó (pengék) eszközök használatát. A teljes személyzetet képezni kell biobiztonság tekintetében, ahogy az a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja és le van írva a következő National Institute of Health's publication-ban: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. A mintakezelésbe bevont teljes személyzetet be kell oltani HBV-ra és HAV-ra, amelyre vakcinák elérhetőek, biztonságosak és hatékonyak.
6. A laboratóriumi környezetet ellenőrizni kell, elkerülendő olyan kontaminációkat, mint por, lebegő mikrobiális részecskék a kit fioláinak és mikroplate-inek nyitásakor, és a teszt végzésekor. Védje a szubsztrát TMB-t (TMB & H₂O₂) erős fénytől és kerülje el a munkafelület rázkódását a teszt elvégzésének helyén.
7. Előirat alapján a kitet +2...8°C között tárolja hőmérséklet-ellenőrzött hűtőben vagy hidegszobában.
8. Ne keverje a különböző sarzsszámú kit komponenseket. Ajánlott, hogy a két kit között az azonos sarzsszámú komponenseket se keverje össze.
9. Ellenőrizze, hogy a reagensek tiszták-e, és nem tartalmaznak látható nehéz részecskéket vagy aggregátumokat. Amennyiben ez nem megfelelő javasolja a laboratórium felügyelőjének, hogy intézze a kit cseréjét.
10. Kerülje el a szérum/plazma kereszt-kontaminációt eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével minden minta után.

11. Kerülje el a kereszt-kontaminációt a kit reagensek között eldobható pipettahegyek használatával és azok cseréjével mindegyiknek a használata után.
12. Ne használja a kivet a külső (kartondoboz/másodlagos konténer) és belső (fiolák) címkéken feltüntetett lejárati idő után.
13. Minden mintát potenciálisan fertőzőtként kezeljen. Minden human szérumbintát Biosafety Level 2-n kell kezelni, mint azt a Center for Disease Control, Atlanta, U.S. ajánlja egyetértésben azzal, ami jelente van az Institutes of Health's következő publikációjában: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Eldobható műanyag áru használata ajánlott a mosóoldat elkészítésénél vagy a komponensek automata munkaállványban másik tartóba való átvitelénél a kontamináció elkerülésének céljából.
15. A kit használata során képződött hulladékot a nemzeti irányvonalaknak és a kémiai és biológiai természetű laboratóriumi hulladékokra vonatkozó szabályzóknak megfelelően kell megsemmisíteni. Főleg a mosási folyamatból, a kontrolllok és minták maradékából származó folyadék-hulladékot kell potenciálisan fertőző anyagként kezelni és inaktíválni. Az inaktiváció javasolt folyamatai a kezelés 10%-os végkoncentrációjú háztartási fehérítővel 16-18 órán keresztül vagy hőinaktiválás autoklávban 121°C-on, 20 percig.
16. A véletlenszerű kifröccsenéseket házi fehérítővel átitatott papírtörülkövel fel kell itatni, majd vízzel lemosni. A törölköt ezután meg kell semmisíteni a laboratóriumi/kórházi hulladékhoz kijelölt megfelelő konténerek segítségével.
17. A Stop oldat 0,3M kénsavat tartalmaz. Kerülje a bőrrel és szemmel való érintkezést. Kontakt esetében, öblítse ki azonnal nagy mennyiségű vízzel.
18. Nátrium azid vagy konzerváló tiomerzál tartalmú reagenseket a felhasználói országban érvényes törvények által meghatározott előírások értelmében kezelje. Nátrium azid tartalmú oldatok eltávolítása esetén azonnal öblítse le bő vízzel. Vegye figyelembe azt a tényt, hogy a nátrium azid robbanékony elegyet képez ólom és vörösréz tartós jelenlétében.
19. Ne dohányozzon, egyen igyon vagy ne alkalmazzon kozmetikumokat azon a területen, ahol a mintákat vagy a kit reagenseket használja.
20. Más hulladék anyagokat, amelyek a kit használata során keletkeznek (pl. mintákhoz és kontrolllokhoz használt pipettahegyek, használt mikroplate-k) potenciálisan fertőzőként kell kezelni és a nemzeti szabályzók és laboratóriumi hulladékokra vonatkozó előírások alapján meg kell semmisíteni.
21. Ne pipettázzon szájjal.

G. MINTA: ELŐKÉSZÍTÉS ÉS JAVASLATOK

1. A vért aseptikusan vénapunkcióval kell venni, és a plazmát vagy szérumot a klinikai laboratóriumi analízishez használt mintapreparálási technikák alapján kell előkészíteni. Nem észlelhető különbség a citrátos, EDTA-s és heparinos mintaelőkészítések között.

2. Kerülje el bármilyen tartóítószer hozzáadását a mintákhoz, különösen a nátrium-azidot, mivel ez a vegyszer befolyásolná a konjugátum enzimaktivitását, fals negative eredményeket okozván.
3. A mintákat egyértelműen azonosítani kell kódokkal vagy nevekkkel, acélból, hogy az eredmények helytelen értékelése elkerülhető legyen. Ha a kit véregységek tesztelésére szolgál, a bárkód jelölés és a leolvasás erőteljesen ajánlott.
4. Hemolizált (piros) és láthatóan hyperlipémiás ("tejszerű") mintákat meg kell semmisíteni, mivel azok fals eredményeket generálhatnak. Fibrin vagy nehéz részecskéket vagy mikrobiális filamentumokat és testeket tartalmazó mintákat meg kell semmisíteni, mivel azok fals eredményekhez vezethetnek.
5. A szérumot és a plazmát +2...8°C között lehet tárolni maximálisan a gyűjtést követő 5 napon keresztül. Hosszabb tárolási időszak esetén a mintákat fagyasztva -20°C-n több hónapig lehet tárolni. Bármely fagyasztott mintát csak egyszer szabad lefagyasztani, mivel a többszöri fagyasztás esetén részecskék generálódhatnak, amely befolyásolhatja a teszteredményt.
6. Ha partikulumok vannak jelen, centrifugálja 2.000 rpm-n 20 percig vagy szűrjön 0.2-0.8µm filterek használatával, hogy feltisztítsa a mintát a teszteléshez.

H. A KOMPONENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Nyitott kittel végzett tanulmányok nem mutattak ki semmiféle releváns aktivitás-vesztést 6 hónapig.

1. Microplate:

Engedje, hogy a mikroplate elérje a szobahőmérsékletet (kb. 1 óra) mielőtt kinyitja a tartóját.. Ellenőrizze, hogy a nedvességszívó nem színeződött el sötét zöldre, ami jelzi a hibás tartósítást. Ebben az esetben hívja az Adaltis ügyfél szolgálatot.

A fel nem használt csíkokat vissza kell helyezni az alumínium tasakba szorosan visszazárva és +2...8°C között tárolva.

Első alkalommal történő kinyitáskor a maradék csíkok stabilak két hónapig, vagy addig, amíg a nedvesség-indikátor a deszikkáns tasakon belül sárgáról zöldre nem változik.

2. Negatív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

3. Pozitív kontroll:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Ezt a komponenst potenciálisan fertőzőként kezelje.

4. Mérőszköz:

Gondosan oldja fel a fiola liofilizált tartalmát a saját címkéjén látható módon, EIA tisztaságú vízzel. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Ezt a komponenst potenciálisan fertőzőként kezelje.

Megjegyzés: feloldás esetén a kalibráló már nem stabil.
–20°C hőmérsékleten tartandó.

5. Koncentrált mosó oldat 20x:

(50 mL -es flakon):

A 20x koncentrált oldat belső tartalma bidesztillált vízben hígítandó 1000 mL-ig (a mennyiség a címkén látható) és finoman keverendő használat előtt. Ahogy kristályok vannak jelen a fiolában figyeljen arra, hogy az egész tartalmat feloldja az oldat készítésekor.

Az előkészítésben kerülje el a habosodást, mivel buborékok jelenléte rossz mosási hatásokhoz vezethet.

Megjegyzés: Ha már fel van oldva, a mosóoldat stabil 6 napig +2...8°C között.

6. Konjugátum:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Legyen óvatos, hogy ne szennyezze a folyadékot oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal.

Ha a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

7. TMB szubsztrát:

Használatra kész komponens.

Keverje meg jól vortex-en használat előtt. Legyen óvatos hogy ne szennyezze a folyadékot oxidáló vegyületekkel, levegő-szállított porral vagy mikrobákkal.

Ne tegye ki erős besugárzásnak, oxidáló ágenseknek és fém felszíneknek.

Ha ezt a komponenst transzferálni kell, csak műanyag lehetőség szerint steril, eldobható konténert használjon.

8. Minta hígító:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

9. Stop oldat:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

10. Próbahígító:

Használatra kész. Keverje meg jól vortex-en használat előtt.

I. KÉSZÜLÉKEK ÉS ESZKÖZÖK A KIT HASZNÁLATÁVAL KAPCSOLATOSAN

1. A mikropipettákat kalibrálni kell, hogy az assay által megkívánt korrekt térfogatot szállítsák és rendszeres dekontaminációnak kell alávetni azokat (háztartási alkohol, 10%-os fehérítő oldat, Kórház-szintű fertőtlenítőszer) a részeket, amelyek véletlenül kontaktálódhatnak a mintával. Rendszeresen karban is kell őket tartani. A kifröccsenések és kit komponensek maradványainak dekontaminálását is rendszeresen el kell végezni. Szintén rendszeres karbantartás kell ahhoz, hogy 1% precizitást és $\pm 2\%$ eltérést mutassanak.
2. Az ELISA inkubátort +37°C-re kell beállítani ($\pm 0.5^\circ\text{C}$ toleranciával) és rendszeresen megbizonyosodni arról, hogy tartja a korrekt hőmérsékletet. Mind száraz inkubátorok, mind vízfürdők alkalmasak az inkubáláshoz, amennyiben a készülék validált ELISA tesztek inkubálására.
3. Az ELISA mosó is extrém módon fontos az assay teljes kivitelezéséhez. A mosót óvatosan kell validálni és megfelelően optimalizálni kit kontrolllok és referencia panelek használatával a kitnek a rutin laboratóriumi tesztek során történő használata előtt.

Rendszerint 4-5 mosóciklus (350 μL /cső mosóoldat felszívás + kiengedés = 1 ciklus) elegendő arról megbizonyosodni, hogy a teszt kivitelezése elvárás szerinti. Javasolt 20-30 másodperc áztatási intervallum betartása a ciklusok között. Acélból, hogy azok száma megfelelően beállítható legyen, ajánlott egy assay futtatása a kit kontrolllokkal és jól karakterizált negatív és pozitív referencia mintákkal, és annak ellenőrzésével, hogy az értékek illeszkednek-e az alábbi, "Belső minőségellenőrzés" fejezetben jellettel. A szállított térfogatok kalibrációját és a mosó karbantartását (dekontamináció és a tűk tisztítása) a gyártó utasításai alapján kell elvégezni.

4. Az inkubációs időknél van egy $\pm 5\%$ -os toleranciája.
 - ✓ Rövid inkubáció módszer (az 1./2. inkubációra a tolerancia 43 perc és 47 perc közötti; a 3. inkubációra a tolerancia 14 perc és 16 perc közötti).
 - ✓ Standard inkubáció módszer (az 1. inkubációra a tolerancia 57 perc és 63 perc közötti.; a 2. és a 3. inkubációra a tolerancia 29 és 31 perc közötti).
5. Az ELISA mikroplate readert 450 nm-es leolvasófilterrel kell szállítani és ideálisan egy másik filterrel (620-630nm) blankolási célokhoz A standard kivitelezéseknek a következőknek kell lenniük: (a) sáv szélesség $\leq 10\text{nm}$; (b) abszorbancia tartomány 0 tól ≥ 2.0 ; (c) linearitás ≥ 2.0 -ig; (d) ismételhetőség $\geq 1\%$. A blankolást az "Eljárás menete" fejezetben azonosított csövecskén kell elvégezni. A reader optikai rendszerét rendszeresen kell kalibrálni, hogy megbizonyosodjon a megfelelő optikai denzitás mérésében. Ezt rendszeresen karban kell tartani a gyártó utasításai alapján.
6. Az ELISA automatizált munkapult kit használata esetén az összes kritikus lépés (diszpenzáció, inkubáció, mosás, leolvasás, adatkezelés) gondosan ellenőrizendő, kalibrálandó és rendszeresen elrendezendő az O Belső minőség kontroll című részekben jelenlévő értékekkel való megfelelés megőrzésére. A próba protokoll az egység működési rendszerébe installálandó és engedélyezve kell lennie a mosóhoz és a leolvasóhoz. Mi több, a folyékony komponenseket mozgó leálló résznek (diszpenzáció és mosás) engedélyeztetnek és szabályosan beállítottak kell lennie. Főként, nagyon gondosan el kell kerülnie a használt tűk közé becsípődést a diszpenzáció és a mosás esetén. Alaposan tanulmányozza és ellenőrizze a közeli sejtszennyeződés lehetőségének minimálisra csökkentése céljából. Az ELISA automatizált munkapultok használata akkor javasolt a vér screening-hez, amikor a tesztelendő minták száma nagyobb mint 20-30 munkaszakaszi egység.

L. TESZT ELŐTTI KONTROLLOK ÉS TEVÉKENYSÉGEK

1. Ellenőrizze a kit lejárati idejét, amely a külső címkére van nyomtatva. Ne használja az eszközt, ha lejárt.
2. Ellenőrizze, hogy a folyékony komponensek nem kontaminálódtak-e látható részecskékkel vagy aggregátumokkal. Ellenőrizze, hogy a Szubsztrát szintelen vagy halvány kék, úgy, hogy felszívja azt steril műanyag pipettával. Ellenőrizze, hogy nem tört

- össze semmi sem a szállítás során és nincs kifröccsent folyadék a dobozon belül. Ellenőrizze, hogy az alumínium tasak, amely a mikroplate-t tartalmazza és nincs megszúrva és nem károsodott
- Higítsa meg a 20x koncentrált mosópuffer teljes mennyiségét a fentiekben leírtak szerint.
 - Higítsa meg a Kalibrálót, mint az fent le van írva.
 - Engedje, hogy mindegyik komponens elérje a szobahőmérsékletet (kb. 1 óra) és aztán finoman keverje meg vortexen az összes folyékony reagenst a leírás szerint.
 - Állítsa be az ELISA inkubátort $+37^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ -ra és készítse elő az ELISA mosót a hígított mosóoldatos priming-gal a gyártói utasítások szerint. Állítsa be a mosóciklusok pontos számát, ahogy az I.3 részben található.
 - Ellenőrizze, hogy az ELISA reader be van kapcsolva és bizonyosodjon meg arról, hogy legalább 20 perccel a leolvasás előtt be let kapcsolva.
 - Automata munkaállomást használva kapcsolja be, ellenőrizze a beállításokat és legyen biztos abban, hogy a helyes protokollt használja,
 - Ellenőrizze, hogy a mikropipetták a kívánt értékre vannak beállítva.
 - Ellenőrizze, hogy minden más készülék rendelkezésre áll és használatra kész.
 - Problémák esetén ne dolgozzon tovább a teszttel és kérve a supervisor tanácsát,

M. AZ ELJÁRÁS MENETE

A próbát az alábbiakban leírtak szerint kell elvégezni, figyelve arra, hogy mindegyik mintánál ugyanazon inkubációs időt tartsuk be.

A próba két inkubációs eljárással valósítható meg: Válassza ki a saját szabályozásnak megfelelőt:

- Standard inkubáció az (1^a inkubációra 60 perc, a 2^a és a 3^a inkubációra 30 perc)
- Rövid inkubáció (az 1^a és a 2^a inkubációra 45 perc, a 3^a inkubációra 15 perc)

1. Standard inkubáció - Kézi próba:

- Helyezze a kívánt mennyiségű csövecskét a csövecske tartóba. Hagyja az 1. csövecskét üresen a blank részére.
- Tegyén be 200 µL háromszoros feloldott negatív kontroll mennyiséget, 200 µL kétszeresen feloldott a kalibrálót és 200 µL egyszer feloldott a pozitív kontroll mennyiséget a közeli csövecskékbe. Az kontrollerek és a kalibráló nem igényel hígítást, már előhígított állapotban használatra készek!
- Adjon hozzá 200 µL minta hígítót a minta csövecskébe, majd oldjon fel 10 µL mintát minden egyes, szabályosan beazonosított csövecskébe. Enyhén rázza meg a lemezt elkerülve a közeli csövecskék kifolyását és szennyezését a minta teljes oldása céljából a saját hígítójában.

Fontos megjegyzések: Ellenőrizze a minta hígító színét, a minta hozzáadása után ennek világos zöldről sötét kékeszöldre kell váltania jelezve, hogy a minta hozzáadás megtörtént.

- Oldjon fel 50 µL próba hígítót az ellenőrzők/kalibrálók és minták összes csövecskébe. Ellenőrizze, hogy a minták színe sötét kék.

- Inkubálja a mikroplate-t **60 percig $+37^{\circ}\text{C}$ -on**.
Fontos megjegyzés: a csíkok a készlethez tartozó, megfelelő tapadólappal borítandók kizárólag kézzel végzett teszt esetén. A csíkok nem fedhetők be automatizált ELISA eszköz használata esetén.
- Mossa a Microplatet automata mosóegységgel 350 µL/hígított mosóoldat csövecske meghagyásával és szívásával az I.3. részben előírt módon.
- Pipetázzon 100 µL enzim társítót mindegyik csövecskébe kivéve a blank csövecskéket, és fedje le a fóliával.
Ellenőrizze, hogy ez a vörös színű komponens az összes csövecskében fel van oldva, kivéve az A1 kamrát.

Fontos megjegyzés: ügyeljen arra, hogy ne üsse meg a társítóval telített hegygel a csövecske belső műanyag felületét. Kontamináció következhet be.

- Inkubálja a Microplat-et **30 percig $+37^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten**.
- Öblítse le a csövecskéket az I.3. részben leírt módon.
- Pipetázzon 100 µL TMB szubsztrát keveréket az összes csövecskébe és blank csövecskébe is. Inkubálja a Microplatet **a környezeti hőmérsékleten ($18-24^{\circ}\text{C}$) 30 percig**.

Fontos megjegyzés: Ne tegye ki erős sugárzásnak. Magas háttér generálódhat.

- Pipetázzon 100 µL Stop oldatot bármelyik részbe a 10. pontban leírt sorrendben az enzim reakció leállítására végett. A Stop oldat hozzáadása a pozitív kontrollereket és a negatív kontrollereket kékről sárgára fogja megváltoztatni.
- Mérje meg az oldat színintenzitását minden kamrában az I.5. részben leírt módon, 450 nm reader filterrel és lehetőleg, 620-630nm filterrel a Microplate A1 pozícióban levő, blank eljárás esetén.

Fontos megjegyzések:

- Ha a második filter nem áll rendelkezésre, bizonyosodjon meg arról, hogy a mikroszó alján nincs ujjlenyomat a 450 nm-es leolvasás előtt. Az ujjlenyomatok fals pozitív eredményeket okozhatnak a leolvasásánál.
- A leolvasást ideálisan a Stop oldat hozzáadását követően, azonnal meg kell tenni, de nem később, mint 30 perccel azután. A kromogénnek néminemű ön-oxidációja jöhet létre a magas háttér miatt.
- 350 ± 150 rpm rázás az inkubáció során körülbelül 20% adagolás szenzibilitást mutatott.

2. Rövid inkubáció - Kézi próba:

- Helyezze a kívánt mennyiségű csövecskét a csövecske tartóba. Hagyja az 1. csövecskét üresen a blank részére.
- Adjon 200 µL m negatív kontrollt triplikátumban, 200 µL kalibrálót duplikátumban és 200 µL pozitív kontrollt unikátumban a közeli csövecskébe felpipetázva és leengedve homogenizálás céljából. Az kontrollerek és a kalibráló nem igényel hígítást, már előhígított állapotban használatra készek!

3. Adjon 200 µL minta hígítót a minta összes csövecskéjébe, majd oldjon fel 10 µL mintát minden egyes, szabályosan beazonosított csövecskébe. Rázza meg finoman elkerülve a túlfolyást és a további csövecskék kontaminációját.

Fontos megjegyzések: ellenőrizze a minta hígító színét, a minta hozzáadása után ennek világos zöldről sötét kékeszöldre kell váltania jelezve, hogy a minta hozzáadás megtörtént.

4. Oldjon fel 50 µL próba hígítót a kontrollok/kalibrálók és minták összes csövecskéjébe. Ellenőrizze, hogy a minták színe sötétkék.
5. Inkubálja a Microplatet **45 percig +37°C hőmérsékleten**.
Fontos megjegyzés: Fedje le csíkokat biztonságosan mikroplate fedővel kézzel végzett teszt esetén. A csíkok nem fedhetők le az automatizált ELISA eszköz használata esetén.
6. Öblítse le a Microplate-t automata mosóegységgel 350 µL/hígított mosóoldat csövecské meghagyásával és szívásával az I.3. részben előírt módon.
7. Pipettázzon 100 µL enzim társítót az összes csövecskébe kivéve a blank-et és fedje le a tapadó lappal. Ellenőrizze, hogy ez a vörös színű komponens az összes csövecskében fel van oldva, kivéve az A1 -et.

Fontos megjegyzések: Legyen óvatos, hogy ne érintse a csövecské műanyag belső felületét a konjugátummal töltött pipettahegygel. Kontamináció jelentkezhet.

8. Inkubálja a Microplatet **45 percig +37°C hőmérsékleten**.
9. Öblítse le a csövecskéket az I.3. részben leírt módon.
10. Pipettázzon 100 µL TMB szubsztrát keveréket az összes csövecskébe és a blank-be is. Inkubálja a Microplatet környezeti hőmérsékleten (18-24°C) **15 percig**.

Fontos megjegyzések: Ne tegye ki erős sugárzásnak. Magas háttér generálódhat.

11. Pipettázzon 100 µL Stop oldatot bármelyik részbe a 10. pontban leírt sorrendben az enzim reakció leállítása végett. A Stop oldat hozzáadása a pozitív kontrollokat és a pozitív mintákat kékről sárgára fogja megváltoztatni.
12. Mérje meg az oldat színintenzitását minden csövecskében az 1.5. részben leírt módon, 450 nm reading filterrel és lehetőleg, 620-630nm filterrel a Microplate A1 pozícióban levő, blank eljárás esetén.

Fontos megjegyzések:

1. Ha a második filter nem áll rendelkezésre, bizonyosodjon meg arról, hogy a mikrocső alján nincs ujjlenyomat a 450 nm-es leolvasás előtt. Az ujjlenyomatok fals pozitív eredményeket okozhatnak a leolvasásánál.
2. A leolvasást ideálisan a Stop oldat hozzáadását követően, azonnal meg kell tenni, de nem később, mint 30 perccel azután. A kromogénnek néminemű ön-oxidációja jöhet létre a magas háttér miatt.

3. 350 ± 150 rpm rázás az inkubáció során körülbelül 20% adagolás szenzibilitást mutatott.

N. TESZTSÉMA

Módszer	Műveletek (Standard inkubáció)	Műveletek (Rövid műveletek)
Kontrollok és Kalibráló	200 µL	200 µL
Minta hígító és minta	200 µL hígító+ 10 µL minta	200 µL hígító+ 10 µL minta
Próba hígító	50 µL	50 µL
1a inkubáció	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Hőmérséklet	+37°C	+37°C
Mosás	4-5 ciklus	4-5 ciklus
Enzimes Konjugátum	100 µL	100 µL
2a inkubáció	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Hőmérséklet	+37°C	+37°C
Mosás	4-5 ciklus	4-5 ciklus
TMB szubsztrát	100 µL	100 µL
3a inkubáció	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Hőmérséklet	Környezeti hőmérséklet (18...24°C)	Környezeti hőmérséklet (18...24°C)
Stop oldat	100 µL	100 µL
OD leolvasás	450/620nm	450/620nm

A diszpenzációs séma mintáját mutatja az alábbi táblázat:

(mindkét inkubáció eljárásra érvényes):

		Microplate											
		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											

Jelmagyarázat: BLK = Fehér NC = Negatív kontroll CAL = Kalibráló PC = Pozitív kontroll S = Minta

O. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

Ellenőrzést kell végezni a a kontrollokon és a kalibrátoron mindenkor, amikor verifikálni szükséges, hogy a várt OD450/620 nm értékek beleillenek-e a vizsgálatba a táblázatban látható módon.

Ellenőrzés	Követelmények
Blank	< 0.100 OD 450/620nm érték
Negatív kontroll (NC)	< 0.050 köztes érték OD450/620nm fehér kivonat után
Kalibráló	S/Co >1.1
Pozitív kontroll	>1.000 OD450/620nm érték

Ha a teszteredmény illeszkedik a követelményekhez a fentiek szerint, lépjen tovább a következő lépéshez/fejezethez.

Ha nem, akkor ne végezzen következő lépést, hanem végezze el a következő ellenőrzéseket:

Probléma	Ellenőrzés
Blank > 0.100 OD450nm	1. hogy a Szubsztrát oldat nem kontaminálódott az assay során
Negatív kontroll (NC) > 0.050 OD450nm blaning után	1. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 2. hogy a megfelelő mosóoldatot használták és a mosót prime-olták azzal használat előtt; 3. hogy nem csináltak hibát az assay folyamatában (pozitív kontroll becseppentése negatív kontroll helyett); 4. hogy a negatív kontroll kontaminációja vagy a csövecskéké, ahová a kontroll cseppentve van jelentkezett pozitív minták fröccsenése vagy az enzim konjugátumba jutása miatt, 5. hogy a mikropipetták nem kontaminálódtak pozitív mintákkal vagy enzim konjugátummal 6. hogy a mosó tűi nem dugultak vagy részlegesen elzáródtak.
Kalibráló S/Co < 1.1	1. szabályosan elvégzett eljárások esetén; 2. nem hibáztak az elosztása alatt (pl., negatív kontroll diszpenzáció a kalibráló helyett); 3. a mosási eljárás és a mosóegység beállításai hitelesítve voltak az előminősítési tanulmányok során; 4. a kalibráló külsőleg nem szennyeződött.
Pozitív kontroll <1.000 OD450nm	1. hogy a folyamat megfelelően lett elvégezve; 2. hogy nem csináltak hibát a kontroll folyamatában (negatív kontroll becseppentése pozitív kontroll helyett); Ebben az esetben a negatív kontroll OD450nm > 0.150 3. hogy a mosási eljárás és a mosó beállítások validáltak az előkvalifikációs tanulmányban; 4. hogy a pozitív kontrollnak semmilyen külső kontaminációja nem jelentkezett.

Amennyiben a fenti problémák bármelyike jelentkezik, jelentse a problémát a supervisornak további teendők végett.

P.AZ EREDMÉNYEK SZÁMOLÁSA

A teszteredményeket a következő formula által meghatározott cut-off értékek segítségével kell számolni:

$$\text{Cut-off (Co)} = \text{NC közepes} + 0.350$$

A teszthez talált érték használt az eredmények értékeléséhez, mint az a következő fejezetben le van írva.

Q. AZ EREDMÉNYÖSSZEG KIRTÉKELÉSE

A teszt eredmények értelmezése a minta OD450nm és a cut-off érték (vagy S/Co) közötti arány alapján történik a következő táblázatnak szerint:

S/Co	Kiértékelés
< 0.9	Negatív
0.9 - 1.1	Téves
> 1.1	Pozitív

A negatív eredmény jelzi, hogy a beteg nem HCV vírus fertőzött vagy, hogy a véregység transzfúzióra alkalmas. Azonos eredménnyel rendelkező betegek újból tesztelendők 1-2 héttel későbbi minta alapján. A véregység nem alkalmas transzfúzióra. A pozitív eredmény jelzi, hogy a beteg HCV vírus fertőzött, tehát a beteg eszerint kezelendő és a véregység hulladékkezelendő.

Fontos megjegyzések:

- Az eredmények értékelését a laboratóriumi felelős ellenőrzése alatt kell végezni, csökkentendő a megítélési hibákat és félreértékeléseket.
- Az ismételt pozitív eredményeket Konfirmációs tesztnek kell alávetni, ami képes mérni az IgG és az IgM (konfirmációs teszt) antitesteket mielőtt a vírusos hepatitisz fertőzés diagnózisát kibocsájtják.
- Amint termék teljesítményértékelés során jelezük, az az analízis képes megállapítani a „core” anti-HCV antitestek szérum konverziót egyéb, kereskedelmi készlet használata előtt. Ennél fogva a nem megerősített, pozitív eredmény ezekkel a kereskedelmi készletekkel nem kizárható hamis, pozitív eredményként! Minden esetben a minta konfirmációs tesztet végezzen.
- Lévé, hogy a próba képes meghatározni az IgM osztályzatú antitesteket is, eltérések érzékelhetők egyéb, anti IgM Konjugátumot nem tartalmazó kereskedelmi eszközökkel anti-HCV antitestek tesztelésére. HCV antitest próba valós pozitivitása megerősítendő utóbb az IgM reaktivitás vizsgálatával is, ami fontos a HCV fertőzés diagnózishoz.
- Amikor a teszteredményeket a laboratóriumból az informatikai centrumba juttatják, figyelni kell arra, hogy elkerüljék a hibás adatátvitelt.
- A vírusos hepatitisz infekció diagnózisát minősített orvosnak kell megtennie és kibocsátania a beteg felé.

Kiszámítási példa:

A következő adatok nem használhatók a felhasználó által kapott, valós adatok helyett.

Negatív kontroll: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Köztes érték: 0.020 OD450nm kisebb mint 0.050 – Elfogadott

Pozitív kontroll: 2.189 OD450nm

Magasabb mint 1.000 – Elfogadott

Cut-off = 0.020+0.350 = 0.370

Kalibráló: 0.550 - 0.530 OD450nm

Köztes érték: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co magasabb mint 1.1 – Elfogadott

1. minta: 0.070 OD450nm

2. minta: 1.690 OD450nm

1. minta S/Co < 0.9 = negatív

2. minta S/Co > 1.1 = pozitív

R. SZOLGÁLTATÁS

A teljesítmény értékelés a Közösségi Műszaki Sajátosságok (5. cikk., 3. fejezet, IVD, 98/79/EC irányelv) értelmében mindkét inkubáció esetén (standard és rövid).

1. MÉRÉSI HATÁR

A próba begyűjtés kiszámítása a brit munkaszabványok anti-HCV, NIBSC, 06/188-006 kód. rövid inkubáció eljárás használatával történik. Az alábbi táblázaton az OD450nm átlag értékek láthatók, negatív majd bevizsgált plazmában hígított standard esetén.

Hígítás	Tétel#1	Tétel#2	Tétel#3
Faktor	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
Negatív plazma	0,25	0,20	0,20

Ugyanakkor a kódolt minta, Accurun 1 - széria 3000 – a Boston Biomedica Inc., USA által elérhetőn, értékelése "in toto" történt az alábbi eredményekkel:

Accurun 1 széria	Tétel#1	Tétel#2	Tétel#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. DIAGNOSZTIKAI SPECIFIKÁCIÓ ÉS SENZITIVÁS

A berendezés teljesítményértékelése külsőleg történt több mint 5000 minta alapján.

2.1 Diagnosztikai specifikáció

Negatív jegyzésű próbaként meghatározott specifikus analízis hiányában. Összesen, több mint 5000, alkalmoszerű donátor került vizsgálatra, beleértve az első donátorokat is.

A diagnosztikai sajátosság hitelesített egy, az US FDA engedélyezett kit ellenében.

5043 donátor volt tesztelve 99.5% sajátosság kialakításával.

210 beutalt beteg HCV vírus tesztelve volt; 99.5%-án diagnosztikai specifikációt észleltek. Ugyanakkor, a diagnosztikai specifikáció bizonyított 162 potenciálisan interferáló minta tesztelésével (egyéb fertőző betegségek, E. coli pozitív antitestek, nem vírusos hepatitiszes betegségek, dialízis betegek, várandós nők, hemolizátumos, lipémiás betegek stb.) Elfogadott a 100%-os sajátosság érték.

Nem észleltek hamis reaktivitást a mintaelőkészítési módszer használata miatt. Felhasználásra kerültek úgy a különféle előkészítési standard technikákkal derivált plazmák (citrát, EDTA és heparin), mint a szérumok a specifikus értékek meghatározására. A begyűjtés és tartósítás miatti interferenciák ellenőrzésére befagyasztott minták kerültek felhasználásra. Nem észleltek interferenciát.

2.2 Diagnosztikai szenzitivitás

Fennáll annak a lehetősége, hogy a próba pozitív eredményt hozzon, specifikus analizálandó próbák hiányában. A diagnosztikai szenzitivitás külsőleg bizonyított összesen 348 mintán; 100%-os diagnosztikai

szenzitivitást észleltek. Belsőleg, több mint 50 pozitív minta került tesztelésre szintén 100%-os diagnosztikai szenzitivitás észlelésével.

Sor került a HCV-től genotípustól eltérő genotípusok által okozott fertőzések pozitív próbáinak tesztelésére.

Ugyanakkor, a szerokonverziós munkapultok többségét tanulmányoztuk, amiket a Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) és a Zeptomatrix, USA, (HCV) rendelkezésünkre állított.

Ezek közül néhány itt látható.

Panel	Minta sz.	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

Megjegyzés:

1. Pozitív minták
2. HCV v.3.0

Végül a témék tesztelve volt az EFS Ac HCV, 06.140817 sz. tétel, az Etablissement Francais Du Sang (EFS), Franciaország, rendelkezésre állított felület által, a következő eredményekkel:

EFS Ac HCV panel

Minta	Tétel#1 S/Co	Tétel#2 S/Co	Tétel#3 S/Co	Várható eredmények
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negatív
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitív
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitív
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitív
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitív
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitív

3. PRECÍZIÓ

Öt minta, egy negatív és négy pozitív minta alapján került kiszámításra, 4 ismétlés vizsgálatával, hat külön menetben:

Az eredmények a következők:

Intra lot eredmények: EIAgen Detect HCV AB (v.4) kit: 1st Lot (rövid inkubációs eljárás)

Minta	S/Co átlag	Precízió - %CV		
		Tesztben belül	Tesztben kívül	Teljes
Negatív	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitív	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

Intra lot eredmények: EIAgen Detect HCV AB (v.4) kit: 1st Lot (hosszú inkubációs eljárás)

Minta	S/Co átlag	Precízió - %CV		
		Tesztben belül	Tesztben kívül	Teljes
Negatív	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitív	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

Intra lot eredmények: EIAgen HCV Ab (v.4) kit - 1^o, 2^o és 3^o lot (rövid inkubációs eljárás)

Minta	Precízió - %CV		
	1. lot	2. lot	3. lot
Negatív	8,65	8,29	6,13
Kalibráló	4,98	4,44	5,38
Pozitív	4,11	3,11	1,37

A táblázatokon látható változékonyság nem a minták téves osztályozásából származik.

S. PROBLÉMAMEGOLDÁSI JAVASLATOK

Kapcsolódván a tesztfolyamathoz és a specifikációkhoz is a reagensek korrekt használata és a megfelelő pipettázás által elkerülhetőek a következő típusú hibák.

HIBA	LEHETSÉGES OKOK / JAVASLATOK
OD nagyon különbözik ($\pm 50\%$) a leírt QC-tól	<ul style="list-style-type: none"> - a reagensek nem megfelelő becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a becseppentett térfogat és az assay által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - a nem megfelelő hőmérséklet vagy inkorrekt inkubációs idő (javaslat: több figyelem az inkubátor karbantartása tekintetében, lejegyzendő az inkubáció kezdete) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban (javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait) - a Szubsztrát vagy Konjugátum kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon)

Alacsony reprodukálhatóságú eredmények	<ul style="list-style-type: none"> - a minták vagy reagensek nem konstans becseppentési térfogata (javaslat: ellenőrizze a pipetta-pontosságot, ellenőrizze a becseppentett térfogat és az assay által megkövetelt térfogat egyezőségét: recalibrálja a pipettát) - hiba a mosásban vagy a fotométeres leolvasásban (javaslat: ellenőrizze a készülékek működéseit vagy beállításait) - a Szubsztrát kontaminációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag tartókat használjon) - reagensek kontaminációja vagy degradációja (javaslat: csak egyszerhasználatos és tiszta műanyag hegyeket és tartókat és desztillált vagy azonos vizet használjon)
nincs kolorimetrikus reakció szubsztrát hozzáadását követően	<ul style="list-style-type: none"> - néhány reagens nincs bepipettázva - konjugátumok vagy a Szubsztrát erős kontaminációja - hibák az assay kivitelezésében (pl. reagens véletlenszerű pipettázása rossz sorrendben vagy rossz fiolából stb.)
túl alacsony reakció (túl alacsony OD)	<ul style="list-style-type: none"> - inkubációs idő túl rövid, inkubációs hőmérséklet túl alacsony - inkorrekt konjugátum hígítás
Túl magas reakció (túl magas OD)	<ul style="list-style-type: none"> - inkorrekt konjugátum hígítás - az inkubációs idő túl hosszú, inkubációs hőmérséklet túl magas - vízminőség a mosópufferhez elégtelen (alacsony szintű deionizáció) - elégtelen mosás (a konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
megmagyarázhatatlan eredmények	<ul style="list-style-type: none"> - a pipetták kontaminációja, hegyek és tartók - inkonstant és elégtelen mosás (konjugátumok nincsenek megfelelően eltávolítva)
Túl magas belső CV%	<ul style="list-style-type: none"> - reagesek és/vagy csíkok nincsenek előmelegítve szobahőmérsékletre használat előtt - a plate mosó nem mos megfelelően (javaslat: tisztítsa meg a mosófejet)
Túl magas külső CV%	<ul style="list-style-type: none"> - inkubációs kondíciók nem állandóak (idő, hőmérséklet) - a kontrolllok és a minták nem ugyanabban az időben lettek pipettázva (azonos időközökkel) (ellenőrizze a pipettázási sorrendet) - személy-függő különbségek

T. AUTOMATIZÁCIÓ

Ezen használati utasításban azonosított folyamat kézi tesztelésre vonatkozik. Automata készülékek használata esetén, kövesse az utasításokat, amelyek a készülék gyártójának kézikönyvében vannak benne. A laboratóriumoknak követniük kell az ő validációs folyamataikat, hogy ezen termék kompatibilitását mutassák automatizált rendszereken.

U. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

Egyes, hamis, pozitív eredmények megismétlődési mértéke, amelyeket a konfirmációs RIBA vagy hasonló technikák általi eredmények nem támasztottak alá, bizonyítottan alacsonyabb mint a népesség 0,1%-ában. Fibrin vagy aggregátum részecske tartalmú fagyasztott minták kiolvasztásuk után, hamis pozitív mintákat generáltak.

IRODALOMJEGYZÉK

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. Fingerhood 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. A cikk megtalálható: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. A Nemzeti Egészségügyi Hivatal által szervezett, C hepatitisz konferenciára készült, amit 1997 március 24-26.-án tartottak Bethesda Maryland-ban
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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.

L'affidabilità dei risultati è garantita soltanto se le istruzioni vengono seguite attentamente.



Fabbricante:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27






















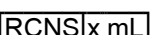



20122 Milano (Italy)

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

www.adaltis.net

it

SIMBOLI UTILIZZATI NELLE ETICHETTE

Italiano 							
	Dispositivo Medico Diagnostico in Vitro	Numero di Catalogo	Numero di Lotto	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'uso	Limiti di Temperatura	Utilizzare Entro	Numero di Test
							
	Fabbricante	Proteggere dalla Luce Solare	Data di Fabbricazione	Micropiastrea	Controllo Positivo	Controllo Negativo	Calibratore
							
	Coniugato	Diluyente Campioni	Substrato TMB	Soluzione Bloccante (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Tampone di Lavaggio Concentrato 20x	Diluyente del Saggio	Ricostituire con x mL
							
	Rischio Biologico	Pericolo	Attenzione				

Attenzione:

Soluzione Bloccante classificata come: Skin Corr. 1A



- **Avvertenza:**
Pericolo
- **Componenti pericolosi che ne determinano l'etichettatura:**
Acido solforico
- **Indicazioni di pericolo:**
H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
- **Consigli di prudenza:**
P260 Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P303+P361+P353 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.
P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P310 Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P405 Conservare sotto chiave.
P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con la regolamentazione locale/regionale/nazionale/ internazionale.

Attenzione:

Controllo Negativo, Controllo Positivo, Calibratore, Coniugato, Diluyente Campioni, Diluyente del Saggio e Tampone di Lavaggio Concentrato 20X classificati come: Skin Sens. 1



- **Avvertenza:**
Attenzione
- **Componenti pericolosi che ne determinano l'etichettatura:**
Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- **Indicazioni di pericolo:**
H317 Può provocare una reazione allergica cutanea
- **Consigli di prudenza:**
P261 Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P321 Trattamento specifico (vedere su questa etichetta).
P333+P313 In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P302+P352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua.
P501 Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con la regolamentazione locale/regionale/nazionale/ internazionale.

Per le Schede di Sicurezza fare riferimento a www.adaltis.net.

A. FINALITA' D'USO

Dosaggio Immunoenzimatico (ELISA) di quarta generazione per la determinazione degli anticorpi anti Virus dell'Epatite C in plasmi (EDTA, Eparina e Citrato) e sieri umani. Il kit può essere usato per la ricerca degli anticorpi nelle unità di sangue di pazienti affetti da HCV. Solo per uso diagnostico in vitro.

B. INTRODUZIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce l'infezione da Epatite C come segue:

“L'Epatite C è un'infezione virale del fegato che è stata attribuita a epatiti “non A, non B” parenteralmente trasmesse fino all'identificazione dell'agente causante nel 1989. La scoperta e la caratterizzazione del virus dell'epatite C (HCV) porta alla comprensione del suo primario ruolo nelle epatiti post-trasfusione e la sua tendenza ad indurre infezioni persistenti”.

L'HCV è trasmesso principalmente per contatto diretto con sangue umano. Le maggiori cause di HCV nel mondo sono l'uso di unità di sangue non controllato per le trasfusioni e il riutilizzo di aghi e siringhe non adeguatamente sterilizzati.

Nessuno vaccino è al momento disponibile per prevenire l'epatite C e il trattamento delle epatiti C croniche troppo costoso perché i popoli dei paesi in via di sviluppo possano permetterselo. Allora, da una prospettiva globale, il più grande impatto sui malati di epatite C sarà ottenuto focalizzando gli sforzi sulla riduzione dei rischi della trasmissione di HCV da esposizioni nosocomiali (trasfusioni di sangue, iniezioni non sicure) e comportamenti ad alto rischio (iniezione di droghe).

Il virus dell'epatite C (HCV) è uno dei virus (A, B, C, D, e E), che sono responsabili della maggioranza dei casi di epatite virale. E' un virus RNA avvolto della famiglia Flaviviridae che mostra di avere uno stretto spettro d'ospite. Gli umani e gli scimpazee sono le sole specie suscettibili all'infezione ed entrambi sviluppano le stesse malattie. Una caratteristica importante del virus è la relativa mutabilità del genoma, che è probabilmente legata all'alta tendenza (80%) nell'indurre infezioni croniche. L'HCV è riunito in diversi genotipi distinti che possono essere importanti nella determinazione della gravità della malattia e la risposta al trattamento.

Il periodo di incubazione dell'infezione da HCV primadell'inizio dei sintomi clinici va da 15 a 150 giorni. Nelle infezioni acute i sintomi più comuni sono affaticamento e itterizia; comunque la maggior parte dei casi (tra il 60% e il 70%), anche quelli che sviluppano l'infezione cronica, sono asintomatici. Circa l'80% dei nuovi pazienti infettati sviluppa un'infezione cronica. Cirrosi si sviluppano all'incirca dal 10 % al 20% che hanno un'infezione cronica, mentre cancro al fegato si manifesta tra l'1% e il 5% delle persone che hanno un'infezione cronica per un periodo da 20 a 30 anni. La maggior parte di pazienti che soffrono di cancro al fegato che non presentano infezione da epatite B mostrano infezione da HCV. Il meccanismo per cui l'infezione da HCV porta al cancro al fegato non è ancora ben chiaro.

L'epatite C accresce la gravità delle malattie del fegato quando coesiste con altre condizioni epatiche. In particolare, le malattie del fegato progrediscono più rapidamente in persone con malattie epatiche provocate da abuso di alcol e con infezione da HCV. L' HCV è trasmessa principalmente per contatto diretto con sangue infetto. La trasmissione attraverso trasfusioni di sangue non esaminato per l'HCV, il riutilizzo di aghi, siringhe e altre attrezzature mediche non adeguatamente sterilizzate, o attraverso lo scambio di aghi tra drogati, è molto ben documentata. La trasmissione per via sessuale o perinatale può anche avvenire ma meno frequentemente. Altri modi di trasmissione legati a pratiche comportamentali, sociali, culturali (body piercing, circoncisioni e tatuaggi) possono avvenire se vengono utilizzati strumenti non adeguatamente sterilizzati. L' HCV non è trasmesso attraverso starnuti, abbracci, tosse, cibo o acqua, condividendo posate o bicchieri o per contatto casuale. Sia nei paesi sviluppati che quelli in via di sviluppo, gruppi ad alto rischio includono gli utilizzatori di droghe iniettabili, I riceventi di sangue non esaminato, emofilici, dializzati e persone con numerosi partners sessuali che praticano rapporti non protetti. Nei paesi sviluppati, si stima che il 90% delle persone con infezione da HCV cronica siano principalmente utilizzatori di droghe iniettabili e quelli con una storia di trasfusioni di sangue non esaminato o emoderivati. Nella maggior parte dei paesi in via di sviluppo, dove sangue e emoderivati non esaminati sono ancora usati, il principale mezzo di trasmissione dell'infezione sono strumenti per le iniezioni non sterilizzati e trasfusioni di sangue non controllato. Inoltre le persone che praticano riti sacrificali e circoncisioni sono a rischio se usano o riusano ferri non sterilizzati.

L'OMS stima che circa 170 milioni di persone, il 3% della popolazione mondiale sono infettate da HCV e sono a rischio di sviluppare cirrosi e/o cancro al fegato. La prevalenza dell'infezione HCV in Africa, Medio Oriente, Sud Est asiatico e Pacifico occidentale è alta se comparata con Nord America ed Europa.

I test diagnostici per HCV sono usati per prevenire l'infezione attraverso lo screening dei donatori di sangue e plasma, per stabilire la diagnosi clinica e prendere meglio decisioni riguardo la cura di un paziente. I tests diagnostici oggi disponibili sono basati su dosaggi immunoenzimatici (EIA) per la rilevazione di specifici anticorpi HCV. Il sistema EIA può rilevare più del 95% di pazienti cronicamente infetti ma solo dal 50% al 70% delle infezioni acute. Un saggio immunoblot ricombinante (RIBA) che identifica gli anticorpi che reagiscono con antigeni individuali HCV è spesso usato come un test supplementare per la conferma di un risultato EIA positivo. Test per HCV basati sull'amplificazione dell' RNA (es. PCR, saggio a DNA legato) è anche stato usato per la conferma del risultato serologico sia per l'assegnazione di un'efficace terapia antivirale. Un risultato positivo indica la presenza di infezione attiva e la possibilità di diffusione dell'infezione e/o lo sviluppo di malattie croniche del fegato.

Farmaci antivirali come l'interferone assunto da solo o in combinazione con ribavirina, può essere usata per il trattamento di persone con epatite C cronica, ma il costo

del trattamento è molto alto. Il trattamento con interferone da solo è efficace in circa il 10%-20% dei pazienti. L'interferone combinato con ribavirina è efficace nel 30%-50% dei pazienti. La ribavirina non sembra essere efficace quando usata da sola.

Non c'è nessun vaccino efficace contro l'HCV. La ricerca procede ma l'alta mutabilità del genoma dell'HCV complica lo sviluppo di un vaccino. La mancanza di conoscenze di qualche risposta immuno-protettiva seguente l'infezione da HCV impedisce anche la ricerca del vaccino. Nemmeno si sa se il sistema immunitario è in grado di eliminare il virus.

Qualche studio comunque ha mostrato la presenza di anticorpi neutralizzanti il virus nei pazienti affetti da HCV. In assenza di un vaccino, devono essere prese tutte le precauzioni per prevenire l'infezione incluse (a) screening e test di sangue e organi; (b) disattivazione del virus in plasmi e prodotti derivati; (c) accrescimento e mantenimento delle pratiche di controllo dell'infezione nei protocolli d'attenzione sanitaria, come l'appropriata sterilizzazione di strumenti medici e dentali; (d) la promozione di cambiamenti nei comportamenti tra la gente comune e gli operatori sanitari per ridurre l'uso eccessivo di iniezioni e la pratica di iniezioni sicure; (e) la riduzione del rischio per persone che fanno uso di droga e pratiche sessuali ad alto rischio".

Il genoma codifica per i componenti strutturali, una proteina nucleocapsidica e glicoproteine dell'envelope, e i costituenti funzionali coinvolti nella replicazione del virus e nel processamento delle sue proteine. La regione codificante nucleocapsidica sembra essere la più conservativa tra gli isolati ottenuti nel mondo.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Le micropiastre sono coattate con antigeni HCV-specifici derivanti dalle regioni "core" e "ns" codificanti per i conservativi e i determinanti antigenici immunodominanti (Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi).

La fase solida è prima trattata con il campione diluito e gli anticorpi HCV sono catturati, se presenti, dagli antigeni. Dopo aver lavato via tutti gli altri componenti del campione, nella seconda incubazione legati gli anticorpi HCV, le IgG e le IgM sono rilevate dall'aggiunta di specifici anticorpi policlonali anti IgG&M, etichettati con perossidasi (HRP).

L'enzima catturato sulla fase solida, reagendo con la miscela substrato TMB, genera un segnale ottico che è proporzionale alla quantità di anticorpi anti HCV presenti nel campione. Un valore di cut-off permette di interpretare le densità ottiche in risultati positivi e negativi in anticorpi HCV.

D. COMPONENTI

Il kit contiene reagenti per 96 tests (codice 071067), 192 tests (codice 071064), o 480 tests (codice 071068).

Micropiastra	1
Controllo Negativo	1x4 mL/flacone
Controllo Positivo	1x2 mL/flacone
Calibratore	2 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	1x50 mL/flacone
Coniugato	1x16 mL/flacone
Diluyente dei Campioni	1x50 mL/flacone
Substrato TMB	1x16 mL/flacone
Soluzione Bloccante	1x15 mL/flacone
Diluyente del Saggio	1x8 mL/flacone
Foglio copripiastra	2
Numero dei tests	96
Codice	071067

Micropiastra	2
Controllo Negativo	2x4 mL/flaconi
Controllo Positivo	1x4 mL/flacone
Calibratore	3 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	2x50 mL/flaconi
Coniugato	2x16 mL/flaconi
Diluyente dei Campioni	2x50 mL/flaconi
Substrato TMB	2x16 mL/flaconi
Soluzione Bloccante	2x15 mL/flaconi
Diluyente del Saggio	2x8 mL/flaconi
Foglio copripiastra	4
Numero dei tests	192
Codice	071064

Micropiastra	5
Controllo Negativo	1x20 mL/flacone
Controllo Positivo	1x10 mL/flacone
Calibratore	7 flaconi
Soluzione di Lavaggio conc. 20x	5x50 mL/flaconi
Coniugato	2x40 mL/flaconi
Diluyente dei Campioni	5x50 mL/flaconi
Substrato TMB	2x40 mL/flaconi
Soluzione Bloccante	2x40 mL/flaconi
Diluyente del Saggio	1x40 mL/flacone
Foglio copripiastra	10
Numero dei tests	480
Codice	071068

1. Micropiastra

12 strips di 8 microcelle coattate con Core peptide, ricombinante NS3, NS4 e NS5 peptidi. Le piastre sono sigillate in una busta di alluminio con essicante.

Portare la micropiastra a temperatura ambiente (18...24°C) prima di aprire la busta. Risigillare le strips non utilizzate nella busta con l'essicante e conservare a 2...8°C.

2. Controllo Negativo

Controllo pronto all'uso. Contiene tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1, 2% di caseina e 0.1% Proclin 150 come conservante. Il controllo negativo è codificato di colore verde oliva.

3. Controllo Positivo

Controllo pronto all'uso. Contiene l'1% di proteine da siero di capra, anticorpi umani positivi all'HCV, tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0±0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azide e 0.1% Proclin 150 come conservanti. Il controllo positivo è codificato di colore verde scuro.

Nota Importante: L'assenza di agenti patogeni vitali nel Controllo Positivo non può essere pienamente garantita,

e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

4. Calibratore

Calibratore liofilo. Deve essere disciolto con il volume di acqua grado EIA riportato sull'etichetta. Contiene proteine da siero bovino fetale, anticorpi all'HCV umani il cui contenuto è calibrato su NIBSC Working Standard codice 06/188-006, 10mM di tampone Na-citrato a pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL di gentamicina solfato e 0.1% di Proclin 150 come conservanti.

Nota Importante: L'assenza di agenti patogeni vitali nel Calibratore non può essere pienamente garantita, e quindi, il reagente deve essere trattato come potenzialmente infetto, in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

Note: il volume necessario per sciogliere il contenuto della fiala può variare da lotto a lotto. Si prega di usare il corretto volume riportato sull'etichetta.

5. Soluzione di Lavaggio Concentrata 20x

Soluzione concentrata 20X. Una volta diluita, la soluzione di lavaggio (tampone di lavaggio diluito) contiene tampone fosfato 10 mM a pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 e 0.05% Proclin 150.

Una volta diluita la soluzione di lavaggio rimane stabile per 1 settimana a 2...8°C.

6. Coniugato

Reagente pronto all'uso e codificato di colore rosso. Contiene perossidasi di rafano coniugata a anticorpi policlonali di capra ad IgG e IgM umane, 5% BSA, tampone Citrato 10 mM a pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclin e 0.05% Tween 20 come conservanti.

7. Substrato TMB

Componente pronto all'uso. Contiene tampone citrato-fosfato 50 mM a pH 3.5-3.8, dimetil-solfossido al 4%, 0.03% di tetrametilbenzidina (TMB) e 0.02% di perossido d'idrogeno (H_2O_2). Miscelare gentilmente prima dell'uso.

Nota: Deve essere conservato protetto dalla luce in quanto sensibile alla forte illuminazione.

8. Diluente del Saggio

Componente pronto all'uso. Contiene siero di capra, soluzione tamponata di Tris 10mM a pH 8.0 ± 0.1 contenente 0.1% di Proclin 150 e 0.09% Na-azide per il pretrattamento dei campioni e dei controlli in piastra, bloccando le interferenze.

9. Soluzione Bloccante

Componente pronto all'uso. Contiene una soluzione 0.3 M di H_2SO_4 . Miscelare gentilmente prima dell'uso.

10. Diluente Campione

Componente pronto all'uso e codificato di colore verde scuro. Contiene 1% di caseina, tampone Na-citrato 10 mM a pH 6.0 ± 0.1 e 0.1% Proclin 150 come conservante.

Usare per diluire il campione.

Nota: Il diluente cambia colore da verde oliva a verde scuro-blu in presenza del campione.

E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (200 μ L e 10 μ L) e puntali usa e getta.
2. Acqua di grado EIA (bidistillata o deionizzata, trattata con carbone attivo per rimuovere gli ossidanti chimici usati come disinfettanti).
3. Timer con intervallo di tempo di 60 min o più.
4. fogli di carta assorbente.
5. Incubatore termostatico calibrato per micropiastre ELISA in grado di fornire una temperatura di +37°C.
6. Lettore calibrato di microcelle ELISA con lettura a 450nm possibilmente con filtri a 620-630nm per la determinazione del bianco.
7. Lavatore calibrato di micropiastre ELISA.
8. Vortex o similari strumenti per miscelare.

F. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico specializzato e correttamente addestrato, sotto la supervisione del medico responsabile del laboratorio. Leggere attentamente questo foglietto illustrativo prima di effettuare il dosaggio ed attenersi scrupolosamente alle istruzioni che vi sono riportate.
2. Leggere attentamente la Scheda di Sicurezza (SDS) prima di effettuare il dosaggio.
3. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue e componenti del sangue, deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale in quel campo (Ministero della Sanità o simili) per eseguire questo tipo di analisi.
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del saggio deve indossare abiti protettivi da laboratorio, guanti in lattice senza talco e occhiali. L'uso di ogni dispositivi appuntito (aghi) o tagliente (lame) dovrebbe essere evitato. Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere addestrato sulle procedure di sicurezza personale, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie di Atlanta, US. e riportato nella pubblicazione dell'Istituto Nazionale di Sanità: "Sicurezza personale nei Laboratori Microbiologici e Biomedici", ed. 1984.
5. Tutto il personale coinvolto nel maneggiare i campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per cui i vaccini sono disponibili sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio dovrebbe essere controllato così da evitare contaminazioni da polvere e agenti microbiologici nell'aria, quando si aprono le fiale e la micropiastra del kit e quando viene eseguito il test. Proteggere il cromogeno/substrato TMB dalla luce forte ed evitare vibrazioni del banco di lavoro una volta iniziato il test.
7. Dal ricevimento, conservare il kit a 2...8°C in un frigorifero o camera fredda a temperatura controllata.
8. Non scambiare i componenti tra differenti lotti del kit. E' raccomandato non scambiare i componenti di due kit dello stesso lotto.
9. Controllare che i reagenti siano limpidi e non contengano grosse particelle o aggregati. Se ciò accade allertare il supervisore del laboratorio per iniziare le necessarie procedure per la sostituzione del kit.
10. Evitare contaminazioni incrociate tra campioni di sieri/plasmi usando puntali monouso e cambiandoli dopo ogni campione.

11. Evitare contaminazioni incrociate tra i reagenti del kit usando puntali monouso e cambiandoli per l'uso di ogni componente.
12. Non usare il kit dopo la data di scadenza impressa sulla confezione esterna e sull'etichetta di ogni singola fiala all'interno.
13. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infetti. Tutti i sieri umani dovrebbero essere maneggiati secondo il Livello 2 di BioSicurezza, come raccomandato dal Centro per il Controllo delle Malattie, Atlanta, US. insieme con quanto riportato nella pubblicazione dell'Istituto di Sanità: "BioSicurezza nei laboratori Microbiologici e Biomedicali", ed. 1984.
14. L'uso di contenitori di plastica monouso è raccomandato per la preparazione dei componenti liquidi o per i componenti trasferiti nelle postazioni automatizzate, questo per evitare contaminazioni incrociate.
15. I prodotti di scarto durante l'uso del kit devono essere scaricati secondo le direttive nazionali e le leggi riguardanti i rifiuti di sostanze chimiche e biologiche di laboratorio. In particolare, gli scarichi liquidi generati dalla procedura di lavaggio, da avanzi dei controlli e dai campioni devono essere trattati come materiali potenzialmente infetti e inattivati prima di essere eliminati. Si suggerisce di inattivare per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 16-18 ore o disattivazione a caldo in autoclave a 121°C per 20 minuti.
16. Rovesciamenti accidentali dei campioni durante le operazioni devono essere assorbiti con fogli di carta imbevuti di ipoclorito di sodio e poi sciacquati con acqua. I fogli di carta vanno poi gettati nell'apposito contenitore dei rifiuti per materiali biologici.
17. La Soluzione bloccante contiene acido solforico allo 0.3 M. Evitare il contatto con pelle e occhi. In caso di contatto sciacquare subito e abbondantemente con acqua.
18. Le soluzioni reagenti che contengono sodio azide o thimerosal quali conservanti, devono essere trattate seguendo le disposizioni e le leggi al riguardo che vigenti nello Stato in cui si opera. L'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide prevede l'uso di acqua corrente in grande quantità. Porre attenzione al fatto che la sodio azide può formare composti esplosivi a contatto prolungato con piombo e rame.
19. Non fumare, non mangiare o applicare cosmetici nelle aree dove campioni e reagenti vengono maneggiati.
20. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: i puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) dovrebbero essere maneggiate come potenzialmente infetti e riposti in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.
21. Non pipettare con la bocca.

G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue è estratto aseptivamente per prelievo in vena e i plasmi o sieri sono preparati usando le tecniche standard di preparazione dei campioni per analisi cliniche di laboratorio. Nessuna influenza è

stata osservata nella preparazione del campione con citrato, EDTA o eparina.

2. Evitare ogni aggiunta di conservanti ai campioni; specialmente sodio azide che può influenzare l'attività enzimatica del coniugato, generando risultati di falsi negativi.
3. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare confusione nell'interpretazione dei risultati. Quando il kit è usato per lo screening di unità di sangue è fortemente raccomandato di etichettare con codici a barre e leggere elettronicamente.
4. Campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattiginosi) devono essere scartati perché potrebbero generare risultati falsi. I campioni contenenti residui di fibrina o grosse particelle o filamenti e corpi microbiologici dovrebbero essere scartati perché potrebbero dare origine a risultati falsi.
5. Sieri e plasmi possono essere conservati a +2...8°C fino a cinque giorni dopo il prelievo. Per conservazioni più lunghe, i campioni possono essere congelati a -20°C per diversi mesi. Qualsiasi campione congelato non può essere congelato e scongelato più di una volta perché questo genera particelle che possono influenzare il risultato del test.
6. Se sono presenti delle particelle centrifugare a 2.000 rpm per 20 minuti o filtrare con filtri a 0.2-0.8µm per pulire il campione da testare.

H. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Studi condotti su un kit aperto non hanno mostrato alcuna rilevante perdita di attività fino a 1 riutilizzo dello stesso materiale in 6 mesi.

1. Micropiastre:

Permettere che la micropiastre raggiunga la temperatura ambiente (almeno 1h) prima di aprire la busta. Controllare che l'essiccante non sia diventato verde scuro, indicando un difetto di conservazione. In questo caso chiamare il servizio clienti Adaltis.

Le strips non utilizzate devono essere riposte nell'apposita busta, in presenza del l'essiccante fornito, sigillate fermamente e conservate a 2...8°C. Dopo la prima apertura le strips residue sono stabili fino a quando l'indicatore di umidità presente all'interno della busta dell'essiccante vira da giallo a verde.

2. Controllo Negativo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

3. Controllo Positivo:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

4. Calibratore:

Sciogliere attentamente il contenuto liofilo della fiala con il volume di acqua di grado EIA riportato sulla sua etichetta. Miscelare su vortex prima dell'uso.

Trattare questo componente come potenzialmente infetto.

Nota: Una volta sciolto il calibratore non è stabile. Conservare in aliquote a -20°C.

5. Soluzione di Lavaggio concentrata 20x: (flacone da 50 mL):

L'intero contenuto della soluzione concentrata 20x deve essere diluita con acqua bidistillata fino a 1000 mL (il volume è riportato sull'etichetta) e miscelata gentilmente prima dell'uso. Dal momento che la soluzione può presentare formazioni cristalline, porre attenzione a dissolvere tutto il contenuto. Nella preparazione evitare di generare schiuma perché la presenza di bolle può diminuire l'efficacia del lavaggio.

Nota: Una volta diluita, la soluzione di lavaggio è stabile per 1 settimana a +2..8°C.

6. Coniugato:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

7. Substrato TMB:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso. Prestare attenzione per non contaminare il liquido con ossidanti chimici, polveri o microbi presenti nell'aria. Non esporre a forte illuminazione, agenti ossidanti e superfici metalliche. Se questo componente deve essere trasferito usare solo contenitori di plastica possibilmente sterili.

8. Diluente del Saggio:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

9. Soluzione Bloccante:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

10. Diluente del Campione:

Pronto all'uso. Miscelare su vortex prima dell'uso.

I. STRUMENTAZIONE USATA IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le micropipette devono essere calibrate per rilasciare il corretto volume richiesto dal saggio e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcool denaturato, candeggina al 10%, soluzione disinfettante ospedaliera) di quelle parti che potrebbero accidentalmente entrare in contatto con il campione. Esse dovrebbero essere tenute controllate per mostrare una precisione dell'1% e una correttezza di $\pm 2\%$. La decontaminazione di schizzi o residui di componenti del kit dovrebbe essere eseguita regolarmente.
2. L'incubatore ELISA dovrebbe essere tarato a 37°C (tolleranza di $\pm 0.5^\circ\text{C}$) e regolarmente controllato per assicurare il mantenimento della temperatura corretta. Entrambi incubatori a secco e bagni ad acqua sono utilizzabili per le incubazioni se gli strumenti sono convalidati per l'incubazione di tests ELISA.
3. Il lavatore ELISA è estremamente importante per la totale riuscita del saggio. Il lavatore deve essere convalidato con attenzione e correttamente ottimizzato. Di solito sono sufficienti 4-5 cicli di lavaggio (aspirazione + dispensazione di 350 μl di soluzione di lavaggio = 1 ciclo) per assicurare che il saggio dia il risultato atteso. E' suggerito un intervallo di soaking di 20-30 secondi tra i cicli.

Per stabilire correttamente il loro numero, si raccomanda di eseguire un test di prova con i controlli del kit e campioni di riferimento ben caratterizzati come positivi o negativi, e controllare la corrispondenza ai valori riportati sotto nella sezione O "Controllo di qualità interno". La regolare calibrazione del volume erogato e la manutenzione del lavatore (decontaminazione e pulizia degli aghi) deve essere compiuta secondo le indicazioni del produttore.

4. I tempi di incubazione hanno una tolleranza di $\pm 5\%$.
 - ✓ Metodo di Incubazione Breve (per la 1^a/2^a incubazione la tolleranza è compresa tra 43 min. e 47 min.; per la 3^a incubazione la tolleranza è compresa tra 14 e 16 min.).
 - ✓ Metodo di Incubazione Standard (per la 1^a incubazione la tolleranza è compresa tra 57 min. e 63 min.; per la 2^a e 3^a incubazione la tolleranza è compresa tra 29 e 31 min.).
5. Il lettore di micropiastre ELISA deve essere dotato di un filtro di lettura di 450nm e idealmente di un secondo filtro (620-630nm) per le operazioni del bianco. Le sue prestazioni standard dovrebbero essere (a) ampiezza di banda $\leq 10\text{nm}$; (b) intervallo di assorbimento da 0 a ≥ 2.0 ; (c) linearità ≥ 2.0 ; (d) ripetibilità $\geq 1\%$. Il bianco è determinato secondo le istruzioni contenute nella sezione "Procedura del Saggio". Il sistema ottico del lettore deve essere calibrato regolarmente per assicurare la corretta misurazione della densità ottica. La manutenzione dovrebbe essere fatta regolarmente secondo le istruzioni del produttore.
6. Quando si usa una stazione di lavoro automatizzata per kit ELISA, tutti i passi critici (dispensazione, incubazione, lavaggio, lettura, manipolazione dei dati) devono essere attentamente controllati, calibrati, e regolarmente sistemati per conservare la corrispondenza con i valori riportati nelle sezioni O "Controllo di qualità interno". Il protocollo del saggio deve essere installato nel sistema operativo dell'unità e convalidato come per il lavatore e il lettore. In più, la parte della stazione che manipola i componenti liquidi (dispensazione e lavaggio) deve essere convalidata e correttamente impostata. Particolare attenzione va mostrata nell'evitare il trascinarsi da parte degli aghi usati per la dispensazione e il lavaggio. Questo deve essere studiato e controllato per minimizzare la possibilità di contaminazione dalle celle adiacenti. L'uso di stazioni di lavoro automatizzate ELISA è raccomandata per lo screening di sangue quando il numero dei campioni da testare è maggiore di 20-30 per corsa della macchina.

L. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE SAGGIO

1. Controllare la data di scadenza del kit, stampata sull'etichetta esterna della scatola. Non usare il kit se è scaduto.
2. Controllare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle o aggregati visibili a occhio nudo. Controllare che il Substrato TMB sia incolore o blu pallido aspirando un piccolo volume dello stesso con una pipetta di plastica sterile trasparente. Controllare che nessuna rottura della confezione sia avvenuta nel trasporto e nessuna fuoriuscita di liquido sia presente all'interno della scatola. Controllare che

la busta di alluminio, contenente la micropiastra, non sia bucata o danneggiata.

3. Diluire tutto il contenuto della Soluzione di Lavaggio concentrata 20x come descritto sopra.
4. Sciogliere il calibratore come descritto sopra.
5. Permettere a tutti i componenti del kit di raggiungere la temperatura ambiente (circa 1h) e poi miscelare come descritto.
6. Impostare l'incubatore ELISA a +37°C e preparare il lavatore ELISA avvinandolo con la soluzione di lavaggio diluita, secondo le istruzioni del produttore. Impostare il corretto numero di cicli di lavaggio come riportato nella sezione I.3.
7. Controllare che il lettore ELISA sia acceso da almeno 20 minuti prima della lettura.
8. Se si utilizza una stazione di lavoro automatizzata, accenderla, controllare le impostazioni e assicurarsi di usare il protocollo corretto.
9. Controllare che le micropipette siano impostate al volume richiesto.
10. Controllare che tutti gli strumenti siano disponibili e pronti all'uso.
11. In caso di problemi non procedere oltre con il test e informare il supervisore.

M. PROCEDURA DEL SAGGIO

Il saggio deve essere eseguito in accordo a quanto riportato di seguito, prestando attenzione a mantenere la stessa incubazione per tutti i campioni da testare.

Il saggio può essere eseguito tramite due procedure di incubazione. Scegliere quella più idonea alla vostra regolamentazione:

1. Incubazione Standard (1^a incubazione 60 minuti, 2^a e 3^a incubazione 30 minuti)
2. Incubazione Breve (1^a e 2^a incubazione 45 minuti, 3^a incubazione 15 minuti)

1. Incubazione Standard - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

Nota importante: Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controllare che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **60 min a +37°C**.
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il

test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.

6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutta le celle, eccetto A1.

Nota Importante: Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di Coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **30 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micropiastra a **temperatura ambiente (18-24°C) per 30 minuti**.

Nota Importante: Non esporre a forte illuminazione diretta. Può determinare fondi alti.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivo e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire una leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

2. Incubazione Breve - Saggio Manuale:

1. Inserire il corretto numero di micropozzetti nell'apposito sostegno. Lasciare la prima cella vuota per le operazioni del bianco.
2. Dispensare 200 µL di Controllo Negativo in triplo, 200 µL di Calibratore in doppio e 200 µL di Controllo Positivo in singolo nelle celle appropriate. Non diluire Controlli e Calibratore in quanto già prediluiti e pronti all'uso!
3. Aggiungere 200 µL di Diluente Campioni a tutte le celle dei campioni; poi dispensare 10 µL di campione in ogni cella propriamente identificata. Agitare gentilmente la piastra, evitando straripamenti e

contaminazioni delle celle adiacenti, per disciogliere completamente il campione nel suo diluente.

Nota importante: Controlla che il colore del Diluente del Campione, dopo l'aggiunta del campione, viri da verde chiaro a verde-blu scuro, indicando che il campione è stato aggiunto.

4. Dispensare 50 µL di Diluente del Saggio in tutte le celle dei controlli/calibratore e dei campioni. Controlla che il colore dei campioni viri a blu scuro.
5. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.
Nota Importante: Le strips devono essere coperte con l'apposito foglio adesivo fornito, solo quando il test è eseguito manualmente. Non coprire la strips quando si usa uno strumento ELISA automatizzato.
6. Lavare la micropiastra con un lavatore automatico rilasciando e aspirando 350 µL/cella di soluzione di lavaggio diluita come riportato nella sezione I.3.
7. Pipettare 100 µL di Coniugato Enzimatico in tutte le celle tranne quella del bianco, e coprire con il foglio adesivo. Controllare che questo componente di colore rosso sia stato dispensato in tutta le celle, eccetto A1.

Nota importante: Attenzione a non urtare la superficie della plastica interna della cella con il puntale pieno di coniugato. Possono avvenire contaminazioni.

8. Incubare la micropiastra per **45 min a +37°C**.
9. Lavare le celle come riportato nella sezione I.3.
10. Pipettare 100 µL di miscela Substrato TMB in ogni cella e anche in quella del bianco. Incubare la micro piastra a temperature ambiente (18-24°C) per **15 minuti**.

Important note: Do not expose to strong direct illumination. High background might be generated.

11. Pipettare 100 µL di Soluzione Bloccante in ciascun pozzetto usando la stessa sequenza di pipettamento descritta nel punto 10 per fermare la reazione enzimatica. L'aggiunta di Soluzione Bloccante farà virare il controllo positivi e i campioni positivi da blu a giallo.
12. Misurare l'intensità di colore della soluzione in ogni cella, come descritto nella sezione 1.5, con un filtro di lettura a 450 nm e possibilmente con un filtro a 620-630nm per le operazioni del bianco in posizione A1 della micropiastra.

Note importanti:

1. Se il secondo filtro non è disponibile assicurarsi che non siano presenti impronte digitali sul fondo della micropiastra prima della lettura a 450nm. Tali impronte potrebbero generare falsi positivi.
2. La lettura deve essere eseguita subito dopo l'aggiunta della Soluzione Bloccante e comunque mai più di 20 minuti dopo tale aggiunta. Può avvenire leggera auto-ossidazione del substrato e portare ad un risultato di fondo alto.
3. L'agitazione a 350 ± 150 rpm durante l'incubazione ha dimostrato che la sensibilità del dosaggio aumenta circa del 20%.

N. SCHEMA DEL SAGGIO

Metodo	Operazioni (Incubazione Standard)	Operazioni (Incubazione Breve)
Controlli & Calibratore	200 µL	200 µL
Diluente Campioni e Campione	200 µL diluente+ 10 µL campione	200 µL diluente+ 10 µL campione
Diluente del Saggio	50 µL	50 µL
1a incubazione	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Coniugato Enzimatico	100 µL	100 µL
2a incubazione	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Lavaggio	4-5 cicli	4-5 cicli
Substrato TMB	100 µL	100 µL
3a incubazione	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Temperatura ambiente (18...24°C)	Temperatura ambiente (18...24°C)
Soluzione Bloccante	100 µL	100 µL
Letture OD	450/620nm	450/620nm

Un esempio di schema di dispensazione è riportato sotto (valido per entrambe le procedure di incubazione):

Micropiastra

	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										

Legenda: BLK = Bianco NC = Controllo Negativo
CAL = Calibratore PC = Controllo Positivo S = Campione

O. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

Un controllo di validazione è eseguito sui controlli e il calibratore ogni volta che il kit viene usato per verificare che le prestazioni del saggio siano conformi sia ai valori di OD450/620nm sia ai valori attesi e riportati nella seguente tabella:

Controllo	Requisiti
Bianco	< 0.100 OD 450/620nm valore
Controllo Negativo (NC)	< 0.050 valore medio OD450/620nm dopo sottrazione del bianco
Calibratore	S/Co >1.1
Controllo Positivo	>1.000 OD450/620nm valore

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti stabiliti sopra, procedere alla prossima sezione.
Se non corrispondono, non procedere ulteriormente e eseguire i seguenti controlli:

Problemi	Controllo
Bianco > 0.100 OD450nm	1. che la soluzione Substrato non si sia contaminata durante il saggio
Controllo Negativo (NC) > 0.050 OD450nm dopo sottrazione del bianco	1. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 2. che sia stata usata la corretta soluzione di lavaggio e che il lavatore sia stato avvinato prima dell'uso; 3. che nessun errore sia stato commesso nella procedura del saggio (dispensazione del controllo positivo invece del negativo); 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione del controllo negativo o delle sue celle a causa di schizzi dei campioni positivi o del coniugato enzimatico; 5. che le micropipette non siano contaminate con campioni positivi o coniugato enzimatico; 6. che gli aghi del lavatore non siano bloccati o parzialmente ostruiti.
Calibratore S/Co < 1.1	1. che le procedure siano state correttamente eseguite; 2. che nessun errore sia avvenuto durante la sua distribuzione (es. dispensazione del controllo negativo al posto del calibratore); 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del calibratore.
Controllo Positivo <1.000 OD450nm	1. che le procedure siano state eseguite correttamente; 2. che nessun errore sia stato commesso nella distribuzione del controllo (dispensazione del controllo negativo al posto del positivo). In questo caso il controllo negativo mostrerà un OD450nm > 0.150 3. che la procedura di lavaggio e le impostazioni del lavatore siano validate secondo gli studi di pre-qualificazione; 4. che non sia avvenuta nessuna contaminazione esterna del controllo positivo

Se si è verificato qualcuno dei problemi riportati sopra, informare il supervisore per ulteriori azioni.

P. RISULTATI

I risultati del test sono calcolati sulla media di un valore di cut-off determinato con la seguente formula:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC medio} + 0.350$$

Il valore trovato per il test è usato per l'interpretazione dei risultati come descritto nel paragrafo successivo.

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del test sono interpretati come il rapporto tra l'OD450nm del campione e il valore del Cut-Off (o S/Co) in accordo con la seguente tabella:

S/Co	Interpretazione
< 0.9	Negativo
0.9 - 1.1	Equivoco
> 1.1	Positivo

Un risultato negativo indica che il paziente non è stato infettato da HCV o che l'unità di sangue può essere trasfusa.

Quei pazienti che mostrano un risultato equivoco dovrebbero essere testati nuovamente su un campione prelevato 1-2 settimane dopo. L'unità di sangue non dovrebbe essere trasfusa.

Un risultato positivo indica la presenza dell'infezione da HCV, quindi il paziente dovrebbe essere trattato di conseguenza e l'unità di sangue dovrebbe essere scartata.

Note importanti:

1. L'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio.
2. Ogni risultato positivo dovrebbe essere confermato da un metodo alternativo in grado di rilevare gli anticorpi IgG e IgM (test di conferma) prima di formulare una diagnosi di epatite virale.
3. Come dimostrato nella valutazione delle prestazioni del prodotto, l'analisi è in grado di rilevare la sierconversione per anticorpi anti-HCV core prima di alcuni altri kit commerciali. Quindi un risultato positivo, non confermato, con questi kit commerciali, non deve essere escluso, come un risultato falso positivo! Il campione deve essere comunque sottoposto ad un test di conferma.
4. Dal momento che il saggio è in grado di determinare anche anticorpi di classe IgM, potrebbero essere rilevate discrepanze con altri prodotti commerciali per la determinazione di anticorpi anti HCV mancanti di coniugato anti IgM. La reale positività del campione per gli anticorpi HCV dovrebbe essere poi confermata esaminando anche la reattività IgM, importante per la diagnosi dell'infezione HCV.
5. Quando i risultati sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione per non trasferire dati errati.
6. La diagnosi di epatite virale deve essere fatta e riferita al paziente solo da personale medico qualificato.

Un esempio di calcolo è riportato di seguito:

I seguenti dati non devono essere usati al posto dei dati reali ottenuti dall'utilizzatore.

Controllo Negativo: 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Valore Medio: 0.020 OD450nm Minore di 0.050 – Accettato

Controllo Positivo: 2.189 OD450nm

Più alto di 1.000 – Accettato

Cut-Off = 0.020+0.350 = 0.370

Calibratore: 0.550 - 0.530 OD450nm

Valore Medio: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4

S/Co più alto di 1.1 – Accettato

Campione 1: 0.070 OD450nm

Campione 2: 1.690 OD450nm

Campione 1 S/Co < 0.9 = negativo

Campione 2 S/Co > 1.1 = positivo

R. PRESTAZIONI

La Valutazione delle Prestazioni è stata condotta in accordo a quanto riportato in Common Technical Specifications o CTS (art. 5, Capitolo 3 di IVD Direttiva 98/79/EC) e ad entrambe le procedure di incubazione (standard e breve).

1. LIMITE DI RILEVAZIONE

Il limite di rilevazione del saggio è stato calcolato usando la procedura di incubazione breve per mezzo del British Working Standard per anti-HCV, NIBSC codice 06/188-006. La seguente tabella riporta i valori medi di OD450nm di questo standard diluito in plasma negativo e poi esaminato.

Diluizione	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Fattore	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
Plasma Negativo	0,25	0,20	0,20

Inoltre il campione codificato Accurun 1 - series 3000 – fornito da Boston Biomedica Inc., USA, è stato valutato “in toto” mostrando i seguenti risultati:

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

2. SPECIFICITA' E SENSIBILITA' DIAGNOSTICHE

La Valutazione delle Prestazioni del dispositivo è stata condotta in un trial esterno condotto su più di 5000 campioni.

2.1 Specificità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare negativo in assenza di un analita specifico. Sono stati esaminati un totale di più di 5000 donatori a caso, inclusi donatori per la prima volta.

La specificità diagnostica era accertata contro un kit approvato US FDA.

5043 donatori sono stati testati fornendo una specificità del 99.5%.

210 pazienti ospedalizzati sono stati testati per HCV; è stata trovata una specificità diagnostica del 99.5%. Inoltre, la specificità diagnostica era accertata testando 162 campioni potenzialmente interferenti (altre malattie infettive, anticorpi positivi E.coli, pazienti affetti da malattie epatiche non virali, pazienti in dialisi, donne incinta, emolizzati, lipemici, etc.). E' stato accertato un valore di specificità del 100%.

Non è stata osservata nessuna falsa reattività dovuta al metodo di preparazione dei campioni. Sia plasmi, derivati con differenti tecniche standard di preparazione (citrato, EDTA e eparina), e sieri sono stati usati per determinare i valori di specificità. Sono stati testati campioni congelati, per verificare interferenze dovute alla raccolta e conservazione. Nessuna interferenza è stata osservata.

2.2 Sensibilità Diagnostica

E' definita come la probabilità del saggio di segnare positivo in assenza di un analita specifico. La sensibilità diagnostica è stata accertata esternamente su un numero totale di 348 campioni; una sensibilità diagnostica del 100% è stata trovata. Internamente sono stati testati più di 50 campioni positivi, fornendo ancora un valore di sensibilità diagnostica del 100%.

Sono stati testati campioni positivi da infezioni provocate da genotipi differenti di HCV.

Inoltre è stata studiata la maggior parte dei pannelli di sieroconversione forniti da Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) e Zeptomatrix, USA, (HCV).

I risultati per alcuni di loro sono riportati di seguito.

Pannello	N° campioni	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

Nota:

1. Campioni Positivi
2. HCV v.3.0

Infine il prodotto è stato testato sul pannello EFS Ac HCV, lot n° 06.140817, fornito dall'Etablissement Francais Du Sang (EFS), Francia, con i seguenti risultati:

Pannello EFS Ac HCV

Campione	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Risultati aspettati
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativo
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Positivo
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Positivo
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Positivo
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Positivo
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Positivo

3. PRECISIONE

E' stata calcolata su cinque campioni, uno negativo e quattro positivi, esaminati in 4 ripetizioni in sei run separate.

I risultati sono riportati di seguito:

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1° Lotto (procedura incubazione breve)

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter Saggio	Intra Saggio	Totale
Negativo	0.03	6.66	10.56	12.48
Positivi	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

Risultati intra-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1° Lotto (procedura incubazione lunga)

Campione	S/Co Media	Precisione - %CV		
		Inter Saggio	Intra-Saggio	Totale
Negativo	0.04	4.67	12.34	13.19
Positivi	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

Risultati inter-lotto: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit -
1°, 2° e 3° Lotto (procedura incubazione breve)

Campione	Precisione - %CV		
	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
Negativo	8,65	8,29	6,13
Calibratore	4,98	4,44	5,38
Positivo	4,11	3,11	1,37

La variabilità mostrata nelle tabelle non è risultata nella misclassificazione dei campioni.

S. SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione, possono evitare i seguenti tipi di errore:

ERRORE	POSSIBILI CAUSE / SUGGERIMENTI
OD molto diverse ($\pm 50\%$) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> -errato volume di dispensazione dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) -errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare l'inizio dell'incubazione) -errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato o del Coniugato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)

Risultati poco riproducibili	<ul style="list-style-type: none"> -volume di dispensazione dei reagenti e dei campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio; tararle nuovamente) -errore nell'esecuzione dei lavaggi o della lettura (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) -contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti) -inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimento: utilizzare puntali appropriati, contenitori di plastica monouso puliti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato	<ul style="list-style-type: none"> -alcuni reagenti non sono stati dispensati -forte contaminazione del Coniugato o del Substrato -errata esecuzione della procedura del saggio (es. dispensazione accidentale dei reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato, ecc.)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> -tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppo bassa -errata diluizione del coniugato
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> -errata diluizione del coniugato -tempo di incubazione troppo lungo, temperature di incubazione troppo alta -qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) -lavaggio non sufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
Inspiegabili risultati	<ul style="list-style-type: none"> -contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori -lavaggio incostante e insufficiente (coniugati non propriamente rimossi)
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> - reagenti e/o non portate a temperature ambiente prima dell'uso - il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> -condizioni di incubazione non costanti (tempo, temperatura) -controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione) -variabilità intrinseca degli operatori

T. AUTOMAZIONE

La procedura descritta in questa istruzione per l'uso è solo per il test in manuale. Quando si utilizzano degli analizzatori automatici, bisogna seguire le istruzioni che sono descritte nei manuali d'uso del dispositivo stesso. Ogni laboratorio deve seguire i propri processi di validazione interna dimostrando la compatibilità con i sistemi automatici.

U. LIMITAZIONI

Ripetibili risultati falsi positivi, non confermati dal RIBA di conferma o tecniche simili, sono stati valutati come inferiori allo 0,1% della popolazione normale. I campioni congelati contenenti particelle di fibrina o aggregati dopo scongelamento hanno mostrato di generare falsi positivi.

BIBLIOGRAFIA

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Należy uważnie przeczytać tę ulotkę przed przeprowadzeniem dozowania i postępować zgodnie z instrukcjami w niej zawartymi.

Przestrzeżenie instrukcji jest warunkiem wiarygodności wyników.



Producent:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Mediolan (Włochy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

pl

SYMBOLE ZASTOSOWANE NA ETYKIETACH

Polski PL							
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	Numer katalogowy	Numer partii	Uwaga, przeczytać instrukcję użycia	Limity temperatury	Zużyć w ciągu	Numer próby
	Producent	Chronić przed słońcem	Data produkcji	Mikropłytką	Kontrola dodatnia	Kontrola ujemna	Kalibrator
	Koniugat	Rozcieńczalnik próbek badanych	Substrat TMB	Roztwór zatrzymujący reakcję (H ₂ SO ₄ 0.3M)	Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	Rozcieńczalnik testowy	Rozpuścić w x mL
	Ryzyko biologiczne	Niebezpieczeństwo	Uwaga				

Uwaga:

Roztwór zatrzymujący reakcję sklasyfikowany jako: Skin Corr. 1A



- Ostrzeżenie:**
Niebezpieczeństwo
- Elementy etykietowania określające zagrożenia:**
Kwas siarkowy
- Zwroty ostrzegawcze:**
H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.
- Zwroty określające warunki bezpiecznego stosowania:**
P260 Nie wdychać pyłu / dymu / gazu / mgły / par / rozpylonej cieczy.
P303 + P361 + P353 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKORĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Splukać skórę pod strumieniem wody/prysznicem.
P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
P310 Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem.
P405 Przechowywać pod zamknięciem.
P501 Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi / regionalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

Uwaga:

Kontrola ujemna, kontrola dodatnia, kalibrator, koniugat rozcieńczalnik próbek badanych, rozcieńczalnik testowy i roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x) sklasyfikowane jako: Skin Sens. 1



- Ostrzeżenie:**
Uwaga
- Elementy etykietowania określające zagrożenia:**
Mieszanina: 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-on [nr EC 247-500-7]; 2-metylo-2H-izotiazol-3-on [nr EC 220-239-6] (3:1)
- Zwroty ostrzegawcze:**
H317 Może powodować reakcję alergiczną skóry.
- Zwroty określające warunki bezpiecznego stosowania:**
P260 Nie wdychać pyłu / dymu / gazu / mgły / par / rozpylonej cieczy.
P280 Stosować rękawice ochronne / odzież ochronną / ochronę oczu / twarzy.
P321 Zastosować określone leczenie (patrz ... na etykiecie).
P333 + P313 W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady / zgłosić się pod opiekę lekarza.
P302 + P352 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ NA SKORĘ: Umyć dużą ilością wody z mydłem.
P501 Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z miejscowymi / regionalnymi / krajowymi / międzynarodowymi przepisami.

Karty charakterystyki są dostępne na stronie www.adaltis.net.

A. CEL STOSOWANIA

Test immunoenzymatyczny (ELISA) czwartej generacji do wykrywania przeciwciał przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu C w osoczu (EDTA, heparyna i cytrynian) i surowicy ludzkiej. Zestaw może być używany do wykrywania przeciwciał w jednostkach krwi pacjentów z HCV.

Tylko do użytku diagnostycznego in vitro.

B. WPROWADZENIE

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) definiuje wirusowe zapalenie wątroby typu C w następujący sposób:

„Wirusowe zapalenie wątroby typu C jest wirusową infekcją wątroby, które określane było jako przenoszone pozajelitowo „zapalenie wątroby typu nie A, nie B” aż do identyfikacji czynnika sprawczego w 1989 roku. Odkrycie i charakterystyka wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) doprowadziły do zrozumienia jego głównej roli w potransfuzyjowym zapaleniu wątroby i jego skłonności do wywoływania uporczywych infekcji.”

Wirus HCV przenoszony jest głównie przez bezpośredni kontakt z ludzką krwią. Głównymi przyczynami HCV na świecie są stosowanie niekontrolowanych jednostek krwi do transfuzji oraz ponowne użycie igieł i strzykawek, które nie zostały odpowiednio wysterylizowane.

Obecnie nie jest dostępna żadna szczepionka, aby zapobiegać wirusowemu zapaleniu wątroby typu C, a leczenie przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C jest zbyt kosztowne, aby większość osób w krajach rozwijających się mogła sobie na nie pozwolić. Zatem, z perspektywy globalnej, największy wpływ na ograniczenie liczby chorych na zapalenie wątroby typu C zostanie prawdopodobnie osiągnięty poprzez skupienie wysiłków na zmniejszeniu ryzyka przenoszenia wirusa HCV w obrębie narażeń szpitalnych (np. transfuzje krwi, niebezpieczne praktyki związane z zastrzykami) i zachowań wysokiego ryzyka (np. dożylnie zażywanie narkotyków).

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest jednym z wirusów (A, B, C, D i E), które są odpowiedzialne za większość przypadków wirusowego zapalenia wątroby. Jest to otoczkowy wirus RNA należący do rodziny Flaviviridae, wykazujący się wąskim zakresem gospodarzy. Ludzie i szympansy są jedynymi znanymi gatunkami podatnymi na infekcje, a oba te gatunki rozwijają podobną chorobę. Ważną cechą wirusa jest względna zmienność genomu, co prawdopodobnie wiąże się z dużą skłonnością (80%) do wywoływania przewlekłych zakażeń. Wirus HCV dzieli się na kilka odrębnych genotypów, które mogą być ważne w określaniu stopnia nasilenia choroby i reakcji na leczenie.

Okres inkubacji infekcji HCV przed wystąpieniem objawów klinicznych wynosi od 15 do 150 dni. W ostrych infekcjach najczęstszymi objawami są zmęczenie i żółtaczka, jednak większość przypadków (od 60% do 70%), nawet tych, które prowadzą do przewlekłego zapalenia, ma charakter bezobjawowy. U około 80% nowo zakażonych pacjentów zapalenie wątroby przyjmuje postać przewlekłą. Marskość wątroby rozwija się u około od 10% do 20% osób z przewlekłym zapaleniem wątroby, natomiast rak wątroby rozwija się u

od 1% do 5% osób z przewlekłym zapaleniem wątroby w okresie od 20 do 30 lat. Większość pacjentów cierpiących na raka wątroby, którzy nie wykazują zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B, wykazuje zakażenie HCV. Mechanizmy, dzięki którym infekcja HCV prowadzi do raka wątroby, są nadal niejasne. Wirusowe zapalenie wątroby typu C nasila również inne choroby wątroby, z którymi współistnieje. Choroby wątroby postępują szybciej u osób z chorobami wątroby spowodowanymi nadużywaniem alkoholu i zakażeniem HCV. Wirus HCV rozprzestrzenia się głównie przez bezpośredni kontakt z zainfekowaną krwią. Przenoszenie wirusa przez transfuzję krwi, która nie jest badana pod kątem zakażenia HCV, przez ponowne użycie nieodpowiednio wysterylizowanych igieł, strzykawek lub innego sprzętu medycznego, lub poprzez udostępnianie igieł przez użytkowników narkotyków, są dobrze udokumentowanymi czynnikami. Wystąpić może również, choć rzadziej, przenoszenie wirusa drogą płciową i okołoporodową. Inne sposoby przenoszenia wirusa, takie jak praktyki kulturowe, społeczne i behawioralne z zastosowaniem procedur przezskórnych (na przykład przekłuwanie uszu i ciała, obrzezanie, tatuowanie) mogą wystąpić, jeśli stosuje się nieodpowiednio sterylizowany sprzęt. Wirus HCV nie rozprzestrzenia się przez kichanie, przytulanie, kaszel, jedzenie lub wodę, używanie wspólnych sztućców lub przypadkowy kontakt.

Zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się, grupy wysokiego ryzyka obejmują osoby zażywające narkotyki drogą dożylną, biorców niebadanej krwi, chorych na hemofilię, pacjentów dializowanych oraz osoby z wieloma partnerami seksualnymi, które uprawiają seks bez zabezpieczenia. W krajach rozwiniętych szacuje się, że 90% osób z przewlekłą infekcją HCV to osoby obecnie lub wcześniej przyjmujące narkotyki drogą dożylną oraz osoby, które przeszły transfuzję niezbadanej krwi lub produktów krwiopochodnych. W wielu krajach rozwijających się, w których nadal stosuje się niebadaną krew i produkty krwiopochodne, głównymi drogami przenoszenia są niesterylizowane urządzenia do iniekcji i transfuzje niebadanej krwi. Ponadto osoby, które stosują tradycyjne praktyki w zakresie skaryfikacji i obrzezania, są zagrożone, jeśli używają lub ponownie wykorzystują niesterylne narzędzia.

WHO szacuje, że około 170 milionów ludzi, czyli 3% światowej populacji, jest zakażonych wirusem HCV i są oni narażeni na ryzyko rozwoju marskości wątroby i/lub raka wątroby. Częstotliwość występowania zakażeń wirusem HCV w Afryce, na Bliskim Wschodzie, w Azji Południowo-Wschodniej i Zachodnim Pacyfiku jest wysoka w porównaniu z Ameryką Północną i Europą.

Testy diagnostyczne na obecność wirusa HCV są stosowane w celu zapobiegania infekcjom poprzez badanie przesiewowe krwi i osocza dawcy, w celu ustalania diagnozy klinicznej i podejmowania lepszych decyzji dotyczących postępowania medycznego w przypadku danego pacjenta. Testy diagnostyczne dostępne obecnie na rynku bazują na odczynach immunosorbcyjnych (EIA) do wykrywania przeciwciał swoistych wobec HCV. System EIA może wykryć ponad 95% chronicznie zainfekowanych pacjentów, ale tylko 50% do 70% ostrych infekcji. Rekombinowany test

immunoblot (RIBA), który identyfikuje przeciwciała reagujące z poszczególnymi antygenami HCV, jest często stosowany jako test uzupełniający dla potwierdzenia pozytywnego wyniku EIA. Test na obecność krążenia wirusa HCV w oparciu o amplifikację RNA (np. reakcja łańcuchowa polimerazy PCR, test bDNA) jest również wykorzystywany do potwierdzenia wyników badań serologicznych, a także do oceny skuteczności terapii przeciwwirusowej. Wynik pozytywny wskazuje na obecność czynnej infekcji i możliwość rozprzestrzeniania się infekcji i/lub rozwoju przewlekłej choroby wątroby.

Leki przeciwwirusowe, takie jak interferon stosowany samodzielnie lub w połączeniu z rybawiryną, mogą być stosowane w leczeniu osób z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, ale koszt takiego leczenia jest bardzo wysoki. Leczenie samym interferonem jest skuteczne u około 10–20% pacjentów. Interferonu w połączeniu z rybawiryną jest skuteczny u 30–50% pacjentów. Rybawiryna nie wydaje się być skuteczna, gdy jest stosowana samodzielnie.

Nie ma skutecznej szczepionki przeciwko HCV. Badania są w toku, ale wysoka zmienność genomu HCV komplikuje rozwój szczepionki. Brak wiedzy na temat jakiegokolwiek ochronnej odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu HCV również utrudnia badania nad szczepionkami. Nie wiadomo, czy układ odpornościowy jest w stanie wyeliminować wirusa.

Jednakże, kilka badań wykazało obecność przeciwciał neutralizujących wirusa u pacjentów z HCV. W przypadku braku szczepionki należy zastosować wszelkie środki ostrożności, aby uniknąć zakażenia, w tym (a) badania przesiewowe krwi i produktów krwiopochodnych, (b) inaktywowanie wirusa w osoczu i produktach pochodnych, (c) zaostrożenie i utrzymanie praktyk w zakresie kontroli zakażeń w placówkach opieki zdrowotnej, takich jak odpowiednia sterylizacja instrumentów medycznych i stomatologicznych, (d) promowanie zmiany zachowania wśród ogółu społeczeństwa i pracowników służby zdrowia w celu zmniejszenia nadużywania zastrzyków i stosowania bezpiecznych praktyk wykonywania iniekcji; (e) doradztwo w zakresie redukcji ryzyka dla osób zażywających narkotyki i stosujących praktyki seksualne wysokiego ryzyka.”

Genom wirusa koduje składniki strukturalne, białko nukleokapsydu i glikoproteiny otoczki oraz składniki funkcjonalne zaangażowane w replikację wirusa i przetwarzanie jego białek. Region kodujący nukleokapsyd wydaje się najbardziej konserwatywny spośród izolatów uzyskanych na świecie.

C. ZASADA TESTU

Mikro płytki są pokryte specyficznymi dla HCV antygenami pochodzącymi z regionów „rdzenia” i „ns” kodującymi konserwatywne i immunodominujące determinanty antygenowe (peptyd rdzenia, rekombinowane peptydy NS3, NS4 i NS5).

Faza stała jest najpierw traktowana rozcieńczoną próbką, a ewentualnie obecne przeciwciała HCV są wychwytywane przez antygeny. Po wypłukaniu wszystkich innych składników próbki, w drugiej inkubacji, po wychwyceniu przeciwciał HCV, wykrywane są

przeciwciała IgG i IgM przez dodanie specyficznych przeciwciał poliklonalnych przeciw IgG i IgM, znakowanych peroksydazą (HRP).

Enzym wychwycony w fazie stałej, w reakcji z mieszaniną substratu TMB generuje sygnał optyczny, który jest proporcjonalny do ilości przeciwciał HCV obecnych w próbce. Wartość odczytu pozwala nam interpretować gęstości optyczne dla pozytywnych i negatywnych wyników na obecność przeciwciał HCV.

D. KOMPONENTY

Zestaw zawiera odczynniki dla 96 testów (kod 071067), 192 testów (kod 071064) lub 480 testów (kod 071068).

Mikro płytki	1
Kontrola ujemna	1x4 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x2 mL/fiolka
Kalibrator	2 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	1x50 mL/fiolka
Koniugat	1x16 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	1x50 mL/fiolka
Substrat TMB	1x16 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	1x15 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	1x8 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	2
Liczba testów	96
Kod	071067

Mikro płytki	2
Kontrola ujemna	2x4 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x4 mL/fiolka
Kalibrator	3 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	2x50 mL/fiolka
Koniugat	2x16 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	2x50 mL/fiolka
Substrat TMB	2x16 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	2x15 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	2x8 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	4
Liczba testów	192
Kod	071064

Mikro płytki	5
Kontrola ujemna	1x20 mL/fiolka
Kontrola dodatnia	1x10 mL/fiolka
Kalibrator	7 fiołki
Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)	5x50 mL/fiolka
Koniugat	2x40 mL/fiolka
Rozcieńczalnik próbek badanych	5x50 mL/fiolka
Substrat TMB	2x40 mL/fiolka
Roztwór zatrzymujący reakcję	2x40 mL/fiolka
Rozcieńczalnik testowy	1x40 mL/fiolka
Folie uszczelniające płytki	10
Liczba testów	480
Kod	071068

1. Mikro płytki

12 pasków po 8 mikrostudzienek powleczonych peptydem rdzeniowym i rekombinowanymi peptydami NS3, NS4 i NS5. Płytki są szczelnie zamknięte w torebce aluminiowej ze środkiem osuszającym.

Doprowadzić mikro płytkę do temperatury pokojowej (18...24°C) przed otwarciem torebki. Nieużywane paski

włożyć z powrotem do torebki. Torebkę należy uszczelnić i przechowywać w temperaturze 2...8°C, z zawartością środka osuszającego.

2. Kontrola ujemna

Kontrola gotowa do użycia. Zawiera 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 2% kazeiny i 0,1% środka konserwującego Proclin 150. Kontrola ujemna jest kodowana w kolorze oliwkowym.

3. Kontrola dodatnia

Kontrola gotowa do użycia. Zawiera 1% białka surowicy koziej, przeciwciała ludzkie dodatnie wobec HCV, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 0,5% Tween 20, 0,09% azydku sodu i 0,1% Proclin 150 jako środki konserwujące. Kontrola dodatnia jest kodowana w kolorze ciemnozielonym.

Ważna informacja: *Brak żywotnych patogenów w kontroli dodatniej nie może być w pełni zapewniony, dlatego też odczynnik ten należy traktować jako potencjalnie niebezpieczny biologicznie, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.*

4. Kalibrator

Kalibrator liofilizowany. Do rozpuszczonego w objętości wody klasy EIA podanej na etykiecie. Zawiera białka płodowe surowicy bydłowej, ludzkie przeciwciała anty HCV, których zawartość jest skalibrowana według normy roboczej NIBSC kod 06/188-006, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1, 0,3 mg/mL siarczanu gentamycyny i 0,1% Proclin 150 jako środki konserwujące.

Ważna informacja: *Brak żywotnych patogenów w kalibratorze nie może być w pełni zapewniony, dlatego też odczynnik ten należy traktować jako potencjalnie niebezpieczny biologicznie, zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.*

Uwaga: *objętość konieczna do rozpuszczenia zawartości fiołki może się różnić w zależności od partii. Stosować właściwą objętość podaną na etykiecie.*

5. Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x)

Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x). Po rozcieńczeniu roztwór do płukania (roztwór buforu do płukania) zawiera 10 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 ± 0,2, 0,05% Tween 20 i 0,05% Proclin 150. Po rozcieńczeniu roztwór do płukania zachowuje stabilność przez 1 tydzień w temperaturze 2...8°C.

6. Koniugat

Gotowy do użycia odczynnik w kolorze czerwonym. Zawiera peroksydazę chrzanową sprzężoną z kozimi przeciwciałami poliklonalnymi dla ludzkich przeciwciał IgG i IgM, 5% BSA, 10 mM buforu cytrynianowego o pH 6,4 ± 0,1, 0,1% Proclin i 0,05% Tween 20 jako środki konserwujące.

7. Substrat TMB

Składnik gotowy do użycia. Zawiera 50 mM buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 3,5-3,8, 4% dimetylosulfotlenku, 0,03% tetra-metylobenzydyny (TMB) i 0,02% nadtlenu wodoru (H₂O₂). Delikatnie wymieszać przed użyciem.

Uwaga: *Należy przechowywać z dala od światła, składnik wrażliwy na silne oświetlenie.*

8. Rozcieńczalnik testowy

Składnik gotowy do użycia. Zawiera kozią surowicę, 10 mM roztworu buforowanego TRIS o pH 8,0 ± 0,1 zawierającego 0,1% Proclin 150 i 0,09% azydku sodu do wstępnej obróbki próbek i kontroli w płytce, blokującego zakłócenia.

9. Roztwór zatrzymujący reakcję

Składnik gotowy do użycia.

Zawiera roztwór 0,3 M H₂SO₄. Delikatnie wymieszać przed użyciem.

10. Rozcieńczalnik próbek badanych

Gotowy do użycia odczynnik w kolorze ciemnozielonym. Zawiera 1% kazeiny, 10 mM buforu cytrynianu sodu o pH 6,0 ± 0,1 i 0,1% środka konserwującego Proclin 150. Stosować do rozcieńczania próbki.

Uwaga: *Rozcieńczalnik w obecności próbki zmienia kolor z oliwkowego na ciemny niebiesko-zielony.*

E. MATERIAŁY WYMAGANE ALE NIE DOSTARCZANE Z ZESTAWEM

1. Kalibrowane mikropipety (200 µL i 10 µL) i jednorazowe końcówki.
2. Woda klasy EIA (podwójnie destylowana lub dejonizowana, poddana obróbce węglem aktywnym w celu usunięcia chemicznych utleniaczy stosowanych jako środki dezynfekujące).
3. Timer z interwałem czasowym 60 min lub więcej.
4. Arkusze bibuły chłonnej.
5. Termostatyczny inkubator skalibrowany dla mikropłytek ELISA, zdolny do zapewnienia temperatury +37°C.
6. Skalibrowany czytnik mikrostudzienek ELISA z filtrem 450 nm (odczyt) i ewentualnie z filtrem 620-630 nm (studzienka pusta).
7. Skalibrowana płuczka mikropłytek ELISA.
8. Worteks lub podobny przyrząd mieszający.

F. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Zestaw powinien być stosowany wyłącznie przez odpowiednio przeszkolony personel pod nadzorem lekarza medycyny nadzorującego laboratorium. Należy uważnie przeczytać tę ulotkę przed przeprowadzeniem testu i postępować zgodnie z instrukcjami w niej zawartymi.
2. Należy uważnie zapoznać się z kartą charakterystyki przed użyciem produktu.
3. Gdy zestaw jest używany do badania przesiewowego jednostek krwi i składników krwi, musi być używany w laboratorium certyfikowanym i kwalifikowanym przez odpowiedni organ krajowy (Ministerstwo Zdrowia lub podobny podmiot) do przeprowadzania badań tego rodzaju.
4. Cały personel biorący udział w przeprowadzaniu oznaczania musi nosić ochronne ubrania laboratoryjne, rękawice bez talku i okulary ochronne. Należy unikać używania jakichkolwiek ostrych (igieł) lub tnących (ostrzy) urządzeń. Cały zaangażowany personel powinien zostać przeszkolony w zakresie procedur bezpieczeństwa biologicznego zgodnie z zaleceniami Centrum Kontroli Chorób w Atlancie

- (USA) i zaleceniami w publikacji Narodowego Instytutu Zdrowia (USA): „Bezpieczeństwo biologiczne w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych”, wyd. 1984.
5. Cały personel zajmujący się obsługą próbek powinien zostać zaszczepiony na obecność HBV i HAV, dla których dostępne i bezpieczne są skuteczne szczepionki.
 6. Środowisko laboratoryjne powinno być kontrolowane w taki sposób, aby uniknąć zanieczyszczeń takich jak kurz lub bakterie przenoszone w powietrzu podczas otwierania fiolek i mikroplatek zestawu oraz podczas wykonywania testu. Chronić substrat (TMB) przed silnym światłem i unikać drgań powierzchni stołu, na którym przeprowadzany jest test.
 7. Po otrzymaniu zestaw przechowywać w temperaturze +2...8°C w lodówce lub w chłodni z regulowaną temperaturą.
 8. Nie zamieniać składników między różnymi partiami zestawów. Zaleca się, aby składniki między dwoma zestawami z tej samej partii nie były wymieniane.
 9. Sprawdzić, czy odczynniki są czyste i nie zawierają widocznych dużych cząstek lub agregatów. W przeciwnym razie należy zgłosić kierownikowi laboratorium, aby zainicjował niezbędne procedury wymiany zestawu.
 10. Unikać wzajemnego zanieczyszczania próbek surowicy / osocza, używając jednorazowych końcówek i zmieniając je po każdej próbce.
 11. Unikać wzajemnego zanieczyszczania odczynników zestawu, używając jednorazowych końcówek i zmieniając je po zastosowaniu każdego składnika.
 12. Nie należy używać zestawu po upływie daty ważności podanej na opakowaniu zewnętrznym i etykietach wewnętrznych (fiolkach).
 13. Traktować wszystkie próbki jako potencjalnie zainfekowane. Wszystkie ludzkie surowice powinny być traktowane zgodnie z poziomem 2 bezpieczeństwa biologicznego, zgodnie z zaleceniami Centrum Kontroli Chorób w Atlancie (USA), a także z zaleceniami w publikacji Narodowego Instytutu Zdrowia (USA): „Bezpieczeństwo biologiczne w laboratoriach mikrobiologicznych i biomedycznych”, wyd. 1984.
 14. Przy przygotowywaniu płynnych składników lub w przypadku przenoszenia składników na zautomatyzowane stacje robocze zalecane jest stosowanie jednorazowych plastikowych naczyń w celu niedopuszczenia do zanieczyszczenia krzyżowego.
 15. Odpady powstałe w trakcie użytkowania zestawu muszą być usuwane zgodnie z krajowymi dyrektywami i przepisami dotyczącymi laboratoryjnych odpadów chemicznych i biologicznych. Odpady płynne powstające w wyniku czyszczenia, pozostałości substancji kontrolnych i próbek należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, który należy inaktywować przed usunięciem. Sugerowane procedury inaktywacji to poddanie działaniu podchlorynu sodu o stężeniu 10% przez 16-18 godzin lub inaktywacja cieplna w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min.
 16. Przypadkowe wycieki z próbek podczas operacji muszą zostać zaadsorbowane bibułą chłoną nasączoną podchlorynem sodu, a następnie splukane wodą. Bibułę chłoną należy następnie wyrzucić do właściwych pojemników przeznaczonych na odpady biologiczne.
 17. Roztwór zatrzymujący reakcję zawiera 0,3 M kwasu siarkowego. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. W przypadku kontaktu preparatu z oczami, przemyć oczy obfitą ilością wody.
 18. Roztwory odczynnika zawierające azydek sodu lub tiomersalu jako środki konserwujące należy traktować zgodnie z odpowiednimi przepisami prawa obowiązującymi w kraju stosowania. Usuwanie roztworów zawierających azydek sodu polega na zastosowaniu dużych ilości bieżącej wody. Należy zwrócić uwagę na fakt, że azydek sodu może tworzyć związki wybuchowe w dłuższym kontakcie z ołowiem i miedzią.
 19. Nie palić, nie jeść i nie stosować kosmetyków w obszarach, w których obsługiwane są próbki i odczynniki.
 20. Inne materiały odpadowe powstałe w wyniku użycia zestawu (przykład: końcówki używane do próbek i kontroli, użyte mikroplatek) powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne i usuwane zgodnie z krajowymi dyrektywami i przepisami dotyczącymi odpadów laboratoryjnych.
 21. Pipetowanie cieczy poprzez zasysanie ustami jest zabronione.

G. PRÓBKII: PRZYGOTOWANIE I ZALECENIA

1. Krew pobierana jest w warunkach aseptycznych przez nakłucie żyły, natomiast osocze lub surowicę przygotowuje się, stosując standardowe techniki przygotowywania próbek do klinicznej analizy laboratoryjnej. Nie zaobserwowano żadnych wpływów podczas przygotowania próbki z zawartością cytrynianu, EDTA i heparyny.
2. Unikać jakiegokolwiek dodawania środków konserwujących do próbek; zwłaszcza azydku sodu, który może wpływać na aktywność enzymatyczną koniugatu, generując fałszywe wyniki negatywne.
3. Próbki muszą być wyraźnie oznaczone kodami lub nazwami, aby nie dopuścić do nieporozumień w interpretacji wyników. Gdy zestaw jest używany do badań przesiewowych jednostek krwi, zaleca się etykiety z kodami kreskowymi i odczyt elektroniczny.
4. Hemolizowane (czerwone) i widocznie hiperlipemiczne („mleczne”) próbki muszą zostać odrzucone, ponieważ mogą generować fałszywe wyniki. Próbki zawierające pozostałości fibryny lub duże cząstki, lub włókna i cząstki mikrobiologiczne należy usunąć, ponieważ mogą prowadzić do fałszywych wyników.
5. Surowicę i osocze można przechowywać w temperaturze +2...8°C przez do pięciu dni po pobraniu. W przypadku dłuższego przechowywania próbki mogą być zamrożone w temperaturze -20°C przez kilka miesięcy. Wszelkie zamrożone próbki nie powinny być zamrożone i rozmrożone więcej niż jeden raz, gdyż może to generować powstawanie cząsteczek, które mogą wpływać na wynik testu.
6. Jeżeli cząstki są obecne, wirować z prędkością 2000 obr./min przez 20 min. lub filtrować przy użyciu filtrów 0,2-0,8µm, aby oczyścić testowaną próbkę.

H. PRZYGOTOWANIE SKŁADNIKÓW I OSTRZEŻENIA

Badanie przeprowadzone na otwartym zestawie nie wykazało żadnej istotnej utraty aktywności do 1 ponownego użycia materiału w ciągu 6 miesięcy.

1. Mikropłytki:

Doprowadzić mikropłytkę do temperatury pokojowej (na przynajmniej 1 godzinę) przed otwarciem torebki. Sprawdzić, czy środek osuszający nie zmienił koloru na ciemnozielony, wskazując na wady w produkcji. W tym przypadku skontaktować się z biurem obsługi klienta firmy Adaltis.

Nie używane paski należy umieścić z powrotem w aluminiowym opakowaniu, z dołączonym środkiem suszącym, odpowiednio zamknąć na zamek i przechowywać w temperaturze +2...8°C. Po pierwszym otwarciu pozostałe paski pozostają stabilne, dopóki wskaźnik wilgotności wewnątrz torebki ze środkiem osuszającym nie zmieni koloru z żółtego na zielony.

2. Kontrola ujemna:

Gotowa do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

3. Kontrola dodatnia:

Gotowa do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Traktować ten składnik jako potencjalnie zainfekowany.

4. Kalibrator:

Dokładnie rozpuścić zawartość liofilizowanej fiołki w objętości wody klasy EIA podanej na etykiecie. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

Traktować ten składnik jako potencjalnie zainfekowany.

Uwaga: Po rozpuszczeniu kalibrator nie jest stabilny. Przechowywać w porcjach w temperaturze -20°C.

5. Roztwór buforu do płukania (koncentrat 20x) (fiołka da 50 mL):

Całą zawartość roztworu do płukania w formie koncentratu 20x należy rozcieńczyć wodą destylowaną do 1000 mL (objętość pokazano na etykiecie) i delikatnie wymieszać przed użyciem. Ponieważ roztwór może zawierać krystaliczne cząstki, należy uważać, aby rozpuścić całą zawartość. Podczas przygotowania należy unikać spieniania, ponieważ obecność pęcherzyków może wpłynąć na wydajność płukania.

Uwaga: Po rozcieńczeniu roztwór do płukania zachowuje stabilność przez 1 tydzień w temperaturze +2...8°C.

6. Koniugat:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Należy uważać, aby nie zanieczyścić płynu utleniającymi substancjami chemicznymi, pyłami lub mikroorganizmami obecnymi w powietrzu. Jeśli składnik ma być przeniesiony, używać tylko plastikowych, możliwie sterylnych pojemników.

7. Substrat TMB:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem. Należy uważać, aby nie zanieczyścić płynu utleniającymi substancjami chemicznymi, pyłami lub mikroorganizmami obecnymi w powietrzu. Nie narażać na silne oświetlenie, środki utleniające i kontakt z

powierzchniami metalowymi. Jeśli składnik ma być przeniesiony, używać tylko plastikowych, możliwie sterylnych pojemników.

8. Rozcieńczalnik testowy:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

9. Roztwór zatrzymujący reakcję:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

10. Rozcieńczalnik próbek badanych:

Gotowy do użycia. Wymieszać na wortexie przed użyciem.

I. PRZYRZĄDY STOSOWANE W POŁĄCZENIU Z ZESTAWEM

1. Mikropipety muszą być odpowiednio skalibrowane w celu zapewnienia właściwych objętości wymaganych dla oznaczania i muszą być poddawane regularnej dekontaminacji (alkohol denaturowany, 10% roztwór wybielacza, środki dezynfekujące klasy szpitalnej) pod kątem tych części, które mogłyby wejść w przypadkowy kontakt z próbką. Powinny być również regularnie kontrolowane w celu zapewnienia wykazywania dokładności 1% i dokładności $\pm 2\%$. Odkazanie wycieków lub pozostałości składników zestawu powinno być przeprowadzane regularnie.
2. Inkubator ELISA musi być ustawiony na +37°C (tolerancja $\pm 0,5^\circ\text{C}$) i regularnie sprawdzany, aby zapewnić utrzymanie prawidłowej temperatury. Zarówno suche inkubatory, jak i łaźnie wodne są odpowiednio do inkubacji, pod warunkiem, że dany instrument jest zatwierdzony do inkubacji testów ELISA.
3. Płuczka ELISA jest niezwykle ważna dla ogólnych wyników oznaczania. Płuczkę należy starannie sprawdzić i prawidłowo zoptymalizować. Zwykle 4-5 cykli płukania (zasysanie + dozowanie 350 μL /studzienkę roztworu do płukania = 1 cykl) wystarczy, aby zapewnić, że oznaczanie będzie przebiegało zgodnie z oczekiwaniami. Sugeruje się namaczania trwające 20-30 sekund między cyklami. Aby poprawnie ustawić ich liczbę, zaleca się przeprowadzenie próby za pomocą zestawu kontrolnego zawierającego kontrole z zestawu i próbki referencyjne odpowiednio scharakteryzowane jako ujemne i dodatnie, a także sprawdzenie, czy wartości podane poniżej w sekcji O „Wewnętrzna kontrola jakości” są zgodne. Regularna kalibracja dostarczanych objętości i konserwacja płuczki (odkazanie i czyszczenie igieł) musi być przeprowadzana zgodnie z instrukcjami producenta.
4. Tolerancja czasów inkubacji wynosi $\pm 5\%$.
 - ✓ Metoda krótkiej inkubacji (dla 1. i 2. inkubacji tolerancja wynosi od 43 do 47 min., dla 3. inkubacji tolerancja wynosi od 14 do 16 min.).
 - ✓ Metoda inkubacji standardowej (dla 1. inkubacji tolerancja wynosi od 57 do 63 min., dla 2. i 3. inkubacji tolerancja wynosi od 29 do 31 min.).
5. Czytnik mikropłytek ELISA musi być wyposażony w filtr odczytu 450 nm i idealnie drugi filtr (620-630 nm) do celów odczytu studzienki pustej. Jego

standardowa wydajność powinna wynosić (a) szerokość pasma ≤ 10 nm; (b) zakres absorpcji od 0 do $\geq 2,0$; (c) liniowość $\geq 2,0$; powtarzalność $\geq 1\%$. Odczyt studzienki pustej przeprowadza się zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w sekcji „Procedura przeprowadzania testu”. Układ optyczny czytnika musi być regularnie kalibrowany w celu zapewnienia prawidłowego pomiaru gęstości optycznej. Należy przeprowadzać regularne konserwacje zgodnie z instrukcjami producenta.

- Podczas korzystania z automatycznego stanowiska ELISA wszystkie krytyczne kroki (dozowanie, inkubacja, płukanie, odczyt, wstrząsanie, przetwarzanie danych) muszą być starannie ustawione, skalibrowane, kontrolowane i regularnie korygowane, aby zapewnić ich zgodność z wartościami podanymi w punktach O „Wewnętrzna kontrola jakości”. Protokół testu musi zostać zainstalowany w systemie operacyjnym urządzenia i zatwierdzony podobnie, jak w przypadku płuczki i czytnika. Ponadto część stacji obsługująca składniki ciekłe (dozowanie i płukanie) musi być kontrolowana i prawidłowo ustawiona. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie dopuścić do przenoszenia przez igły używane do dozowania próbek i płukania. Należy przeprowadzać odpowiednie badania i kontrole, aby zminimalizować możliwość skażenia sąsiednich studzienek z powodu silnie reaktywnych próbek, co doprowadzi do uzyskania fałszywych wyników pozytywnych. Zaleca się stosowanie automatycznych stacji roboczych ELISA do badań przesiewowych krwi i gdy liczba próbek do zbadania przekracza 20-30 jednostek na przebieg.

L. KONTROLE I OPERACJE PRZEPROWADZANE PRZED TESTEM

- Sprawdzić datę ważności zestawu wydrukowaną na etykiecie na zewnątrz pudełka. Nie używać przeterminowanych zestawów.
- Sprawdzić, czy ciekłe składniki nie są zanieczyszczone cząstkami lub agregatami widocznymi gołym okiem. Sprawdzić, czy substrat TMB jest bezbarwny lub bladoniebieski poprzez odessanie jego małej objętości za pomocą przezroczystej jałowej, plastikowej pipety. Sprawdzić, czy podczas transportu nie doszło do pęknięcia opakowania i czy wewnątrz pojemnika nie ma wycieku płynu. Sprawdzić, czy torebka aluminiowa zawierająca mikropłytki, nie jest przebita lub uszkodzona.
- Rozcieńczyć całą zawartość roztworu buforu do płukania (koncentrat 20x), jak opisano powyżej.
- Rozpuścić kalibrator, jak opisano powyżej.
- Pozwolić, aby wszystkie składniki zestawu osiągnęły temperaturę pokojową (przez około 1 godzinę), a następnie wymieszać zgodnie z opisem.
- Ustawić inkubator ELISA na temperaturę $+37^{\circ}\text{C}$ i przygotować płuczkę ELISA przez zalanie jej rozcieńczonym roztworem do płukania, zgodnie z instrukcjami producenta. Ustawić prawidłową liczbę cykli płukania jak podano w sekcji I.3.
- Sprawdzić, czy czytnik ELISA jest włączony przez co najmniej 20 minut przed odczytem.

- W przypadku używania automatycznej stacji roboczej, włączyć ją, sprawdzić ustawienia i upewnić się, że zastosowano właściwy protokół testu.
- Sprawdzić, czy mikropipety są ustawione na wymaganą objętość.
- Sprawdzić, czy wszystkie wymagane urządzenia są dostępne i gotowe do użycia.
- W przypadku problemów nie przystępować do testu i poinformować przełożonego.

M. PROCEDURA PRZEPROWADZANIA TESTU

Oznaczanie należy przeprowadzić zgodnie z poniższym opisem, uważając, aby utrzymać ten sam czas inkubacji dla wszystkich oznaczanych próbek.

Procedura oznaczania może być przeprowadzona z zastosowaniem dwóch różnych procedur inkubacji. Wybrać procedurę zgodną z obowiązującymi rozporządzeniami:

- Inkubacja standardowa (1. inkubacja 60 minut, 2. i 3. inkubacja 30 minut)
- Inkubacja krótka (1. i 2. inkubacja 45 minut, 3. inkubacja 15 minut)

1. Inkubacja standardowa – Oznaczanie ręczne:

- Umieścić wymaganą liczbę mikrostudzienek w uchwycie mikrostudzienek. Pozostawić pierwszą mikrostudzienkę pustą dla operacji odczytu studzienki pustej.
- Dozować 200 μL kontroli ujemnej w trzech powtórzeniach, 200 μL kalibratora w dwóch powtórzeniach i 200 μL kontroli dodatniej w trybie pojedynczym do odpowiednich mikrostudzienek. Nie rozcieńczać kontroli i kalibratora, ponieważ są wstępnie rozcieńczone i gotowe do użycia!
- Dodać 200 μL rozcieńczalnika do wszystkich studzienek z próbkami; następnie odmierzyć 10 μL próbki do każdej prawidłowo zidentyfikowanej studzienki. Delikatnie wstrząsnąć płytką, unikając przelewania i zanieczyszczenia przyległych studzienek, aby całkowicie rozpuścić próbkę w rozcieńczalniku.

Ważna informacja: Upewnić się, że kolor rozcieńczalnika próbek badanych, po dodaniu próbki, zmienia się z jasnozielonego na ciemny zielononiebieski, co oznacza, że dodano próbkę.

- Dodać 50 μL rozcieńczalnika próbek badanych do wszystkich studzienek z kontrolami/kalibratorem i próbkami. Sprawdzić, czy kolor próbek zmienił się na ciemnoniebieski.
- Inkubować mikropłytkę przez **60 min. w $+37^{\circ}\text{C}$** .
Ważna informacja: Paski powinny być pokryte dostarczoną folią samoprzylepną tylko wtedy, gdy test przeprowadza się ręcznie. Nie przykrywać pasków podczas korzystania z automatycznych przyrządów ELISA.
- Opłukać mikropłytkę za pomocą automatycznej płuczki, dozując i zasysając 350 μL /studzienkę rozcieńczonego roztworu do płukania, jak podano w sekcji I.3.
- Odmierzyć pipetą 100 μL koniugatu enzymatycznego do każdej studzienki, za wyjątkiem pierwszej studzienki pustej, i przykryć folią samoprzylepną.

Sprawdzić, czy czerwony barwnik został dodany do wszystkich studzienek z wyjątkiem A1.

Ważna informacja: Należy uważać, aby nie dotknąć plastikowej powierzchni wewnętrznej studzienki za pomocą końcówki wypełnionej koniugatem. Ryzyko zanieczyszczenia.

8. Inkubować mikroplótkę przez **30 min. w +37°C**.
9. Przepłukać studzienki zgodnie z instrukcjami w punkcie I.3.
10. Odmierzyć pipetą 100 µL mieszaniny substratu TMB do każdej studzienki, a także do studzienki pustej. Inkubować mikroplótkę **w temperaturze pokojowej (18...24°C) przez 30 minut**.

Ważna informacja: Nie wystawiać na działanie silnego bezpośredniego oświetlenia. Ryzyko wygenerowania wysokiego poziomu tła.

11. Odmierzyć pipetą 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do każdej studzienki, stosując tę samą sekwencję pipetowania co w etapie 10, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną. Dodanie roztworu zatrzymującego reakcję zmieni kolor kontroli dodatniej i pozytywnych próbek z niebieskiego na żółty.
12. Zmierzyć intensywność koloru roztworu w każdej studzienki, jak opisano w sekcji 1.5, za pomocą filtra 450 nm (odczyt), i możliwie za pomocą filtra 620-630 nm (studzienka pusta) w pozycji A1 na mikroplótkce.

Ważne informacje:

1. Jeśli drugi filtr nie jest dostępny, upewnić się, że na spodzie mikrostudzienki nie widać odcisków palców przed dokonaniem odczytu za pomocą filtra o długości fali 450 nm. Odciski palców mogą generować fałszywe pozytywne wyniki podczas odczytu.
2. Odczyt należy wykonać natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję i zdecydowanie nie później niż 20 minut po jego dodaniu. Nastąpić może również lekkie samoutlenienie substratu, prowadzące do wyższego poziomu tła.
3. Wykazano, że wstrząsanie przy 350 ± 150 obr./min. podczas inkubacji zwiększa czułość testu o około 20%.

2. Inkubacja krótka – Oznaczanie ręczne:

1. Umieścić wymaganą liczbę mikrostudzienek w uchwycie mikrostudzienek. Pozostawić pierwszą mikrostudzienkę pustą dla operacji odczytu studzienki pustej.
2. Dozować 200 µL kontroli ujemnej w trzech powtórzeniach, 200 µL kalibratora w dwóch powtórzeniach i 200 µL kontroli dodatniej w trybie pojedynczym do odpowiednich mikrostudzienek. Nie rozcieńczać kontroli i kalibratora, ponieważ są wstępnie rozcieńczone i gotowe do użycia!
3. Dodać 200 µL rozcieńczalnika do wszystkich studzienek z próbkami; następnie odmierzyć 10 µL próbki do każdej prawidłowo oznaczonej studzienki. Delikatnie wstrząsnąć plótką, unikając przelewania i zanieczyszczenia przyległych studzienek, aby całkowicie rozpuścić próbkę w rozcieńczalniku.

Ważna informacja: Upewnić się, że kolor rozcieńczalnika próbek badanych, po dodaniu próbki, zmienia się z jasnozielonego na ciemny zielono-niebieski, co oznacza, że dodano próbkę.

4. Dodać 50 µL rozcieńczalnika próbek badanych do wszystkich studzienek z kontrolami/kalibratorem i próbkami. Sprawdzić, czy kolor próbek zmienił się na ciemnoniebieski.
5. Inkubować mikroplótkę przez **45 min. w +37°C**.
Ważna informacja: Paski powinny być pokryte dostarczoną folią samoprzylepną tylko wtedy, gdy test przeprowadza się ręcznie. Nie przykrywać pasków podczas korzystania z automatycznych przyrządów ELISA.
6. Opłukać mikroplótkę za pomocą automatycznej płuczki, dozując i zasysając 350 µL/studzienkę rozcieńczonego roztworu do płukania, jak podano w sekcji I.3.
7. Odmierzyć pipetą 100 µL koniugatu enzymatycznego do każdej studzienki, za wyjątkiem pierwszej studzienki pustej, i przykryć folią samoprzylepną. Sprawdzić, czy czerwony barwnik został dodany do wszystkich studzienek z wyjątkiem A1.

Ważna informacja: Należy uważać, aby nie dotknąć plastikowej powierzchni wewnętrznej studzienki za pomocą końcówki wypełnionej koniugatem. Ryzyko zanieczyszczenia.

8. Inkubować mikroplótkę przez **45 min. w +37°C**.
9. Przepłukać studzienki zgodnie z instrukcjami w punkcie I.3.
10. Odmierzyć pipetą 100 µL mieszaniny substratu TMB do każdej studzienki, a także do studzienki pustej. Inkubować mikroplótkę w temperaturze pokojowej (18...24°C) przez **15 minut**.

Ważna informacja: Nie wystawiać na działanie silnego bezpośredniego oświetlenia. Ryzyko wygenerowania wysokiego poziomu tła.

11. Odmierzyć pipetą 100 µL roztworu zatrzymującego reakcję do każdej studzienki, stosując tę samą sekwencję pipetowania co w etapie 10, aby zatrzymać reakcję enzymatyczną. Dodanie roztworu zatrzymującego reakcję zmieni kolor kontroli dodatniej i pozytywnych próbek z niebieskiego na żółty.
12. Zmierzyć intensywność koloru roztworu w każdej studzienki, jak opisano w sekcji 1.5, za pomocą filtra 450 nm (odczyt), i możliwie za pomocą filtra 620-630 nm (studzienka pusta) w pozycji A1 na mikroplótkce.

Ważne informacje:

1. Jeśli drugi filtr nie jest dostępny, upewnić się, że na spodzie mikrostudzienki nie widać odcisków palców przed dokonaniem odczytu za pomocą filtra o długości fali 450 nm. Odciski palców mogą generować fałszywe pozytywne wyniki podczas odczytu.
2. Odczyt należy wykonać natychmiast po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję i zdecydowanie nie później niż 20 minut po jego dodaniu. Nastąpić może również lekkie samoutlenienie substratu, prowadzące do wyższego poziomu tła.

3. Wykazano, że wstrząsanie przy 350 ± 150 obr./min. podczas inkubacji zwiększa czułość testu o około 20%.

N. SCHEMAT TESTU

Metoda	Czynności (Inkubacja standardowa)	Czynności (Inkubacja krótka)
Kontrole i kalibrator	200 μ L	200 μ L
Rozcieńczalnik próbek badanych i próbka	200 μ L rozcieńczalnik+ 10 μ L próbka	200 μ L rozcieńczalnik+ 10 μ L próbka
Rozcieńczalnik testowy	50 μ L	50 μ L
Pierwsza inkubacja	60 min (\pm 3)	45 min (\pm 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Płukanie	4-5 cykli	4-5 cykli
Koniugat enzymatyczny	100 μ L	100 μ L
Druga inkubacja	30 min (\pm 1)	45 min (\pm 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Płukanie	4-5 cykli	4-5 cykli
Substrat TMB	100 μ L	100 μ L
Trzecia inkubacja	30 min (\pm 1)	15 min (\pm 1)
Temperatura	Temperatura otoczenia (18...24°C)	Temperatura otoczenia (18...24°C)
Roztwór zatrzymujący reakcję	100 μ L	100 μ L
Odczyt gęstości optycznej (OD)	450/620 nm	450/620 nm

Poniżej przedstawiono przykładowy schemat dozowania (dotyczy obu procedur inkubacji):

Mikroplytka

	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										

Objaśnienia: BLK = Pusty NC = Kontrola ujemna
CAL = Kalibrator PC = Kontrola dodatnia S = Próbką

O. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

W przypadku każdego korzystania z zestawu przeprowadzana jest odpowiednia weryfikacja na kontrolach i kalibratorze w celu sprawdzenia, czy parametry oznaczania są zgodne z wartościami OD450/620nm, a także z oczekiwaniami i wartościami podanymi w poniższej tabeli.

Kontrola	Wymogi
Pusta studzienka	< 0,100 wartość OD _{450/620nm}
Kontrola ujemna (NC)	< 0,050 wartość średnia OD _{450/620nm} po odjęciu pustej
Kalibrator	S/Co > 1,1
Kontrola dodatnia	> 1,000 wartość OD _{450/620nm}

Jeżeli wyniki badań spełniają wymogi określone powyżej, przejść do następnej sekcji.

Jeśli tak nie jest, nie kontynuować. Należy wykonać następujące kontrole:

Problem	Kontrola
Pusta studzienka > 0,100 OD _{450nm}	1. Czy roztwór substratu nie uległ zanieczyszczeniu podczas oznaczania.
Kontrola ujemna (NC) > 0,050 OD _{450nm} po odjęciu pustej	1. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 2. Czy stosowany jest odpowiedni roztwór płuczający i czy płuczka została odpowiednio przygotowana przed użyciem. 3. Czy nie popełniono błędów podczas procedury oznaczania (dozowanie kontroli dodatniej zamiast ujemnej). 4. Czy nie wystąpiło skażenie kontroli negatywnej lub jej studzienek z powodu rozprysków próbek dodatnich lub koniugatu enzymatycznego. 5. Czy mikropipety nie są zanieczyszczone przez próbki dodatnie lub koniugat enzymatyczny. 6. Czy igły płuczki nie są zablokowane lub częściowo zastonięte.
Kalibrator S/Co < 1,1	1. Czy procedury zostały przeprowadzone prawidłowo. 2. Czy nie popełniono żadnego błędów podczas dozowania (np. dozowanie kontroli ujemnej zamiast kalibratora). 3. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 4. Czy nie doszło do skażenia zewnętrznego kalibratora.
Kontrola dodatnia <1,000 OD _{450nm}	1. Czy procedury zostały przeprowadzone prawidłowo. 2. Czy nie popełniono błędów podczas dozowania kontroli (dozowanie kontroli ujemnej zamiast dodatniej). W takim przypadku kontrola ujemna wykaże OD _{450nm} > 0,150 3. Czy procedura płukania oraz ustawienia płuczki zostały zatwierdzone zgodnie z badaniami wstępnymi. 4. Czy nie doszło do skażenia zewnętrznego kontroli dodatniej.

Jeśli wystąpił którykolwiek z powyższych problemów, należy zgłosić problem przełożonemu w celu podjęcia dalszych działań.

P. WYNIKI

Wyniki testu są obliczane na podstawie średniej wartości odcięcia określonej za pomocą następującego wzoru:

$$\text{Wartość odcięcia (Co)} = \text{NC śred.} + 0,350$$

Wartość obliczona dla testu jest używana do interpretacji wyników, jak opisano w następnym akapicie.

Q. INTERPRETACJA WYNIKÓW

Wyniki testu są interpretowane jako stosunek próbki OD450nm i wartości odcięcia (lub S/Co) zgodnie z poniższą tabelą:

S/Co	Interpretacja
< 0,9	Wynik ujemny
0,9 - 1,1	Wynik niejednoznaczny
> 1,1	Wynik dodatni

Wynik ujemny wskazuje, że pacjent nie jest zakażony wirusem HCV lub że jednostka krwi może zostać przetoczona.

Każdy pacjent wykazujący wynik niejednoznaczny powinien zostać ponownie przetestowany na drugiej próbce pobranej 1-2 tygodnie później. Jednostka krwi nie może być przetaczana.

Dodatni wynik wskazuje na zakażenie HCV, dlatego należy odpowiednio leczyć pacjenta lub odrzucić daną jednostkę krwi.

Ważne informacje:

1. Interpretacja wyników powinna odbywać się pod nadzorem kierownika laboratorium w celu zmniejszenia ryzyka wystąpienia błędów w ocenie.
2. Każdy wynik pozytywny powinien zostać potwierdzony z zastosowaniem metody alternatywnej, pozwalającej na wykrycie przeciwciał IgG i IgM (test potwierdzający), przed sformułowaniem diagnozy wirusowego zapalenia wątroby.
3. Jak udowodniono w ocenie wydajności produktu, test jest w stanie wykryć serokonwersję dla rdzeniowych przeciwciał anty HCV wcześniej, niż niektóre inne komercyjne zestawy. Dlatego wynik pozytywny, niepotwierdzony komercyjnymi zestawami, nie może być wykluczony jako wynik fałszywie pozytywny! Próbka musi zostać poddana testowi potwierdzającemu.
4. Ponieważ test jest w stanie wykryć również przeciwciała IgM, mogą występować rozbieżne wyniki z innymi komercyjnymi produktami do wykrywania przeciwciał anty-HCV bez koniugatu anty-IgM. Rzeczywisty dodatni wynik testu na przeciwciała przeciwko HCV powinien następnie zostać potwierdzony przez badanie reaktywności IgM, istotne dla diagnozy zakażenia wirusem HCV.
5. Gdy wyniki są przesyłane z laboratorium do centrum informatycznego, należy zwrócić uwagę, aby nie przesyłać błędnych danych.
6. Rozpoznanie wirusowego zapalenia wątroby musi być dokonane i przekazane pacjentowi wyłącznie przez wykwalifikowanego lekarza.

Poniżej przedstawiono przykład obliczeń:

Nie używać poniższych danych zamiast rzeczywistych danych uzyskanych przez użytkownika.

Kontrola ujemna: 0,019 – 0,020 – 0,021 OD450nm

Wartość średnia: 0,020 OD450nm Mniejsza niż 0,050 – Zaakceptowana

Kontrola dodatnia: 2,189 OD450nm

Większa niż 1,000 – Zaakceptowana

Wartość odcięcia = 0,020 + 0,350 = 0,370

Kalibrator: 0,550 - 0,530 OD450nm

Wartość średnia: 0,540 OD450nm S/Co = 1,4
S/Co Większa niż 1,1 – Zaakceptowana

Próbka 1: 0,070 OD450nm

Próbka 2: 1,690 OD450nm

Próbka 1 S/Co < 0,9 = ujemna

Próbka 2 S/Co > 1,1 = dodatnia

R. SKUTECZNOŚĆ

Ocena skuteczności została przeprowadzona zgodnie z opisem zamieszczonym we wspólnych specyfikacjach technicznych (CTS) (Artykuł 5, Rozdział 3 Dyrektywy w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in-vitro 98/79/WE) oraz zgodnie z obiema procedurami inkubacji (standardowa i krótka).

1. GRANICA WYKRYWALNOŚCI

Granica wykrywalności testu została obliczona z zastosowaniem krótkiego testu inkubacji i wytycznych normy British Working Standard for anti-HCV, kod NIBSC 06/188-006. Poniższa tabela podaje średnie wartości OD450nm tego standardu po rozcieńczeniu w osoczu ujemnym, a następnie poddanego badaniu.

Rozcieńczenie	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Czynnik	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
Osocze ujemne	0,25	0,20	0,20

Ponadto próbka kodowana Accurun 1 – seria 3000 – dostarczona przez Boston Biomedica Inc. (USA) została poddana ocenie w całości. Wyniki zamieszczono poniżej:

Seria Accurun 1	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Rozkład na czynniki	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. SWOISTOŚĆ I CZUŁOŚĆ DIAGNOSTYCZNA

Ocena działania urządzenia została przeprowadzona na podstawie próby przeprowadzonej na ponad 5000 próbek.

2.1 Swoistość diagnostyczna

Jest ona definiowana jako prawdopodobieństwo testu do wykazania oceny negatywnej w przypadku braku określonego analitu. Zbadano ogółem 5000 niewyselekcjonowanych dawców, w tym dawców będących dawcami po raz pierwszy.

Swoistość diagnostyczna została oceniona na zestawie zatwierdzonym przez FDA (USA).

Badaniu poddano 5043 dawców. Uzyskano swoistość na poziomie 99,5%.

Badaniu pod kątem HCV poddano 210 hospitalizowanych pacjentów. Uzyskano swoistość na poziomie 99,5%. Ponadto, swoistość diagnostyczną poddano ocenie przez testowanie 162 próbek potencjalnie interferujących (inne choroby zakaźne, pozytywne przeciwciała przeciwko E. coli, pacjenci dotknięci niewirusowymi chorobami wątroby, pacjenci dializowani, kobiety w ciąży, próbki

hemolizowane, próbki lipemiczne itp.). Uzyskano swoistość na poziomie 100%.

Nie zaobserwowano fałszywej reaktywności ze względu na sposób przygotowania próbki. Do określenia wartości swoistości użyto zarówno osocze, otrzymane za pomocą różnych standardowych technik przygotowania (cytrynian, EDTA i heparyna), jak i surowice. Przetestowano również zamrożone próbki w celu sprawdzenia interferencji z powodu zbierania i przechowywania. Nie zaobserwowano interferencji.

2.2 Czułość diagnostyczna

Jest ona definiowana jako prawdopodobieństwo testu do wykazania oceny pozytywnej w obecności określonego analitu. Czułość diagnostyczną poddano ocenie zewnętrznie na łącznej liczbie 348 próbek. Wykryto czułość diagnostyczną na poziomie 100%. Przebadano wewnętrznie ponad 50 innych pozytywnych próbek. Ponownie wykryto czułość diagnostyczną na poziomie 100%.

Badano również pozytywne próbki infekcji generowanych przez różne genotypy HCV.

Ponadto, przebadano większość paneli serokonwersji dostarczonych przez Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) i Zeptometrix, USA, (HCV).

Wyniki dla niektórych z nich podano poniżej.

Panel	Liczba próbek	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

Uwaga:

1. Próbki dodatnie
2. HCV v.3.0

Ostatecznie produkt został przetestowany na panelu EFS Ac HCV, nr partii 06.140817, dostarczonym przez Etablissement Francais Du Sang (EFS) (Francja) z następującymi wynikami:

Panel EFS Ac HCV

Próbka	Partia 1 S/Co	Partia 2 S/Co	Partia 3 S/Co	Wyniki oczekiwane
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Ujemna
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Dodatnia
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Dodatnia
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Dodatnia
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Dodatnia
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Dodatnia

3. DOKŁADNOŚĆ

Obliczono ją na pięciu próbkach, jednej ujemnej i czterech dodatnich, które zbadano w czterech powtórzeniach w sześciu oddzielnych seriach.

Wyniki podano poniżej:

Wyniki wewnętrzseryjne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1. partia (procedura inkubacji krótkiej)

Próbka	Dokładność – %CV			
	Średnia S/Co	Między-seriami	Wewn. serii	Razem
Ujemna	0,03	6,66	10,56	12,48
Dodatnie	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

Wyniki wewnętrzseryjne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1. partia (procedura inkubacji długiej)

Próbka	Dokładność – %CV			
	Średnia S/Co	Między-seriami	Wewn. serii	Razem
Ujemna	0,04	4,67	12,34	13,19
Dodatnie	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

Wyniki międzyseryjne: Zestaw EIAgen HCV Ab (v.4) – 1., 2. i 3. partia (procedura inkubacji krótkiej)

Próbka	Dokładność – %CV		
	Partia 1	Partia 2	Partia 3
Ujemna	8,65	8,29	6,13
Kalibrator	4,98	4,44	5,38
Dodatnia	4,11	3,11	1,37

Zmienność przedstawiona w powyższych tabelach nie spowodowała błędnej klasyfikacji próbki.

S. ZALECENIA W ZAKRESIE ROZWIĄZYWANIA PROBLEMÓW

Przestrzeganie procedury i specyfikacji testu, a także właściwe użycie odczynników i właściwe pipetowanie może pomóc w uniknięciu następujących rodzajów błędów:

BŁĄD	MOŻLIWE PRZYCZYNY / ZALECENIA
OD znacznie różniące się ($\pm 50\%$) od podanych w QC	<ul style="list-style-type: none"> -nieprawidłowa objętość dozowania odczynników (zalecenie: sprawdzić zgodność między objętością ustawioną w pipetach a ilością wymaganą w teście, skalibrować je ponownie) -nieprawidłowa temperatura lub nieprawidłowy czas inkubacji (zalecenie: bardziej skrupulatna konserwacja inkubatora, odnotować początek inkubacji) -błąd w wykonaniu płukania i odczytu fotometrycznego (zalecenie: sprawdzić działanie lub ustawienia odpowiednich przyrządów) -zanieczyszczenie substratu lub koniugatu (zalecenie: używać tylko czystych jednorazowych plastikowych pojemników)
Niski stopień powtarzalności wyników	<ul style="list-style-type: none"> -niestała objętość dozowania odczynników i próbek (zalecenie: sprawdzić dokładność pipet i zgodność między objętością dozowaną a wymaganą, skalibrować je ponownie) -błąd w wykonaniu płukania lub odczytu fotometrycznego (zalecenie: sprawdzić działanie lub ustawienia odpowiednich przyrządów) -zanieczyszczenie substratu (zalecenie: używać tylko czystych jednorazowych plastikowych pojemników) -zanieczyszczenie lub degradacja odczynników (zalecenie: używać odpowiednich końcówek, czystych jednorazowych plastikowych pojemników i wody destylowanej lub odpowiednika)
Brak reakcji kolorymetrycznej po dodaniu substratu	<ul style="list-style-type: none"> -nie wykonano dozowania niektórych odczynników -silne zanieczyszczenie koniugatu lub substratu -nieprawidłowe wykonanie procedury oznaczania (np. przypadkowe dozowanie odczynników w niewłaściwej kolejności lub z niewłaściwego pojemnika itp.)
Zbyt niska intensywność reakcji (zbyt niskie OD)	<ul style="list-style-type: none"> -zbyt krótki czas inkubacji, temperatura inkubacji zbyt niska -nieprawidłowe rozcieńczenie koniugatu
Zbyt wysoka intensywność reakcji (zbyt wysokie OD)	<ul style="list-style-type: none"> -nieprawidłowe rozcieńczenie koniugatu -zbyt długi czas inkubacji, temperatura inkubacji zbyt wysoka -zła jakość wody do przygotowania roztworu do płukania (niski stopień dejonizacji) -niewystarczające płukanie (nieodpowiednie usunięcie koniugatów)
Nieuzasadnione wyniki	<ul style="list-style-type: none"> -zanieczyszczenie pipet, końcówek lub pojemników -niestałe i niewystarczające płukanie (nieodpowiednie usunięcie koniugatów)
zbyt wysokie międzyseryjne CV%	<ul style="list-style-type: none"> -odczynniki i/lub paski nie zostały wstępnie ogrzane do temperatury pokojowej przed użyciem - płuczka do mikroplutek nie płucze prawidłowo (zalecenie: oczyścić głowicę płuczki)

zbyt wysokie wewnątrzseryjne CV%	<ul style="list-style-type: none"> -niestałe warunki inkubacji (czas, temperatura) -kontrola i próbki nie dozowane w tym samym czasie (w tych samych odstępach czasu) (sprawdzić sekwencję pipetowania) -zmienność wynikająca z pracy operatorów
----------------------------------	---

T. AUTOMATYZACJA

Procedura opisana w niniejszej instrukcji użytkownika dotyczy wyłącznie testów ręcznych. Podczas korzystania z analizatorów automatycznych postępować zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika danego urządzenia. Każde laboratorium powinno prowadzić rejestr swoich wewnętrznych procesów walidacji wykazujących zgodność z systemami zautomatyzowanymi.

U. OGRANICZENIA

Powtarzalne wyniki fałszywie dodatnie, niepotwierdzone przez weryfikujący rekombinowany test immunoblot (RIBA) lub podobne techniki, zostały ocenione jako występujące w mniej niż 0,1% normalnej populacji. Wykazano, że zamrożone próbki zawierające cząstki lub agregaty fibryny po rozmrożeniu generują wyniki fałszywie dodatnie.

LITERATURA

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, wyd. *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Edizioni Minerva Medica, Turyn, 1997, 267-70.
4. Dufour MC. Chronic liver disease and cirrhosis. In Everhart JE, wyd. *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. Waszyngton, DC: US Government Printing Office, 1994; Nr publikacji NIH 94-1447, 615-45.
5. Alter MJ, Hadler SC, Judson FN i in. 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 i in. 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 i in. 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 i in. 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 i in. 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 i in. 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 i in. 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 i in. Seroepidemiology of viral infections among intravenous drug users in northern California. *West J Med* 1992;156:30-5.
18. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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 i in. A multicenter study of viral hepatitis in a United States hemophilic population. *Blood* 1993;81:412-8.
22. Kumar A, Kulkarni R, Murray DL i in. 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 i in. 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 i in. 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 i 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 i 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. Artykuł dostępny pod adresem: <http://www.hepnet.com/nih/gretch.html>. Napisany w ramach konferencji Narodowego Instytutu Zdrowia dot wirusowego zapalenia wątroby typu C w dniach 24-26 marca 1997 roku w Bethesda w stanie Maryland (USA)
34. Mondelli, M.U., A. Cerino, F. Bono, A. Cividini, A. Maccabruni, M. Aricò, A. Malfitano, G. Barbarini, V. Piazza, L. Minoli i 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 i 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 i 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 i 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

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
	Producător	A se feri de contactul direct cu razele soarelui	Data fabricației	Microplacă	Control pozitiv	Control negativ	Calibrator
	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/abutiivaporii/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 incubație 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 refolesc 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.
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 $350\ \mu\text{L}$ 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. 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 (distribuție, 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 (distribuție și spălare) trebuie să fie validată și corect setată. O atenție deosebită se va acorda evitării transferului prin intermediul acelor utilizate pentru distribuție 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 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 semnala 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 **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 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 microplaca timp de **30 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 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 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. Măsurati 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%.

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 semnala 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 microplaca 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 microplaca 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 microplaca 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 distribuire (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)

Eșantion	S/Co Medie	Precizie - %CV		
		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)

Eșantion	S/Co Medie	Precizie - %CV		
		În interiorul 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)

Eșantion	Precizie - %CV		
	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 ($\pm 50\%$) față de cele indicate în CC	<ul style="list-style-type: none"> -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	<ul style="list-style-type: none"> -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	<ul style="list-style-type: none"> -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)	<ul style="list-style-type: none"> -timp de incubare prea scurt, temperatură de incubare prea joasă -diluare eronată a conjugatului
Reacție prea intensă (DO prea mari)	<ul style="list-style-type: none"> -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	<ul style="list-style-type: none"> -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	<ul style="list-style-type: none"> -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	<ul style="list-style-type: none"> -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. RESTRICTII

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.




EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067  96

REF 071064  192

REF 071068  480



IVD

CE 0459

Данную инструкцию по применению необходимо внимательно прочитать перед использованием набора
Во время работы необходимо тщательно следовать этой инструкции
При любых отклонениях от данной инструкции по применению достоверность результатов исследования не гарантируется.



Производитель:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

ru

ОБОЗНАЧЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ

на русском языке RU							
	Медицинское устройство для диагностики в лабораторных условиях	Номер по каталогу	Номер партии	Внимание, Прочитайте инструкции по использованию	Ограничение температуры	Срок годности	Количество испытаний
	Производитель	Беречь от попадания прямых солнечных лучей	Дата изготовления	Микропланшет	Положительная контрольная проба	Отрицательная контрольная проба	Калибратор
	Конъюгат	Дилуэнт для Образца	Субстрат ТМБ	Останавливающий раствор (0,5 M H ₂ SO ₄)	Конц. промывочного буфера (20x)	Оценочный разбавитель	Восстановление с помощью x мл
	Биологическая опасность	Опасно	Предупреждение				

Внимание:

Останавливающий раствор классифицирован как: Повр. кожи 1A



- **Сигнальное слово:**
Опасность
- **Обуславливающая опасность продукта компонент (компоненты) для этикетирования:**
Серная кислота
- **Предупреждения об опасности:**
H314 Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз.
- **Меры Предосторожности:**
P260 Не вдыхать пыль/дым/газ/туман/пары/вещество в распыленном состоянии.
P303+P361+P353 При попадании на кожу (или волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду, промыть кожу водой/под душем.
P305+P351+P338 При попадании в глаза: Осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз.
P310 Немедленно обратиться в токсикологический центр или к врачу.
P405 Хранить под замком.
P501 Утилизировать содержимое контейнера / контейнер в соответствии с предписаниями местных / региональных / национальных / международных компетентных служб.

Внимание:

Отрицательная контрольная проба, Положительная контрольная проба, Калибратор, Конъюгат, Дилуэнт для Образца, Оценочный разбавитель, Конц. промывочного буфера (20x) классифицированы как: Чувств. кожи 1



- **Сигнальное слово:**
Предупреждение
- **Обуславливающий опасность продукта компонент (компоненты) для этикетирования :**
Реакционная масса 5-хлор-2- метил-4-изотиазолин-3-она [ЕС-Номер. 247-500-7] и 2-метил-2Н-изотиазол-3-она [ЕС-Номер. 220-239-6] (3:1)
- **Предупреждения об опасности:**
H317 Может вызывать аллергическую кожную реакцию
- **Меры Предосторожности:**
P261 Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/вещества в распыленном состоянии.
P280 Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица.
P321 Особое использование (смотри этикетку).
P333+P313 При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться к врачу.
P302+P352 При попадании на кожу: Промыть большим количеством воды
P501 Утилизировать содержимое контейнера / контейнер в соответствии с предписаниями местных / региональных / национальных / международных компетентных служб.

Информация о Паспортах безопасности (SDS) размещена на сайте www.adaltis.net.

А. НАЗНАЧЕНИЕ

Ферментативный иммуноферментный анализ (ИФА) четвертого поколения предназначен для определения антител к вирусу гепатита С в плазме и сыворотке человека. Набор может использоваться для скрининга компонентов крови пациентов, инфицированных гепатитом С.

Анализ предназначен только для диагностики «in vitro».

В. ВВЕДЕНИЕ

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет гепатит С следующим образом:

«Гепатит С представляет собой вирусную инфекцию печени, которая упоминалась в качестве передаваемой парентерально в качестве «не А- и не В-гепатита» до идентификации возбудителя в 1989 году. Открытие и характеристика вируса гепатита С привели к пониманию его роли в гепатите после трансфузии и его склонности вызывать постоянную инфекцию.

Гепатит С является основной причиной острого гепатита и хронического заболевания печени, включая цирроз и рак печени. В глобальном масштабе, по оценкам, 170 миллионов человек хронически инфицированы гепатитом С, а 3-4 миллиона человек заражаются каждый год. Гепатит С, который распространяется главным образом путем прямого контакта с кровью человека. Основными причинами заражения гепатитом С во всем мире являются использование неэкранированных переливаний крови и повторное использование игл и шприцев, которые не были надлежащим образом стерилизованы. В настоящее время не существует вакцины для профилактики гепатита С, а лечение хронического гепатита С является слишком дорогостоящим в развивающихся странах для большинства людей. Таким образом, с глобальной точки зрения, наибольшее влияние на бремя гепатита С, вероятно, будет достигнуто путем сосредоточения усилий на снижении риска передачи гепатита С от внутрибольничных воздействий (например, при переливании крови, или применении небезопасных методов инъекций), а также высокий риск при зависимостях (например, введение наркотических веществ).

Вирус гепатита С является одним из вирусов (А, В, С, D и E), которые вместе составляют подавляющее большинство случаев вирусного гепатита. Он представляет собой окутанный РНК-вирус в семействе вирусов flaviviridae, который, как представляется, имеет узкий диапазон его носителей. Люди и шимпанзе являются единственным известным видом, восприимчивым к инфекции, причем подобное заболевание развивается у обоих видов. Важной особенностью вируса является относительная изменчивость его генома, что, в свою очередь, вероятно, связано с высокой склонностью (80%) к индуцированию хронической инфекции. Гепатит С сгруппирован в

несколько различных генотипов, которые могут иметь важное значение для определения тяжести заболевания и реагирования на лечение.

Инкубационный период заражения гепатитом С, до появления клинических симптомов, составляет от 15 до 150 дней. При острых инфекциях наиболее распространенными симптомами являются усталость и желтуха; однако большинство случаев (от 60% до 70%), даже те, которые развивают хроническую инфекцию, являются асимптоматическими. Около 80% новорожденных пациентов проявляют развитие хронической инфекции. Цирроз развивается у примерно 10-20% людей с хронической инфекцией, а рак печени развивается у 1% -5% лиц с хронической инфекцией в течение 20-30 лет. Большинство пациентов, страдающих раком печени, у которых отсутствует инфекция вируса гепатита В, свидетельствуют о наличии инфекции гепатита С. Механизмы, с помощью которых инфекция гепатита С приводит к раку печени, все еще неясны. Гепатит С также усугубляет тяжесть основного заболевания печени, когда он сосуществует с другими печеночными состояниями. В частности, заболевание печени прогрессирует быстрее среди людей с алкогольным заболеванием печени и инфекцией гепатита С. Гепатит С распространяется главным образом путем прямого контакта с кровью человека. Хорошо документирована передача через переливание крови, которые не прошли скрининг на инфекцию гепатита С, путем повторного использования неадекватно стерилизованных игл, шприцев или другого медицинского оборудования или путем обмена игл среди потребителей наркотиков. Также может возникать сексуальная и перинатальная передача, хотя подобные случаи возникают реже. При этом могут возникать и другие способы передачи, такие как социальные, культурные, и поведенческие практики, использующие чрескожные процедуры (например, пирсинг ушей и тела, обрезание, татуировка), если используется неадекватно стерилизованное оборудование. Гепатит С не распространяется путем чихания, обнимания, кашля, принятия пищи или воды, совместного использования посуды или случайного контакта.

В развитых и развивающихся странах группы высокого риска включают потребителей инъекционных наркотиков, получателей неэкранированной крови, больных гемофилией, пациентов с диализом и лиц с несколькими половыми партнерами, которые занимаются небезопасным сексом. В развитых странах считается, что 90% лиц с хронической инфекцией гепатита С являются текущими и бывшими потребителями инъекционных наркотиков, а также лицами, имеющими историю переливания неэкранированной крови или продуктов крови. Во многих развивающихся странах, где все еще используются неэкранированные продукты крови и цельной крови, основным средством передачи являются нестерилизованное инъекционное оборудование и неэкранированные переливания крови. Кроме того, люди, которые используют традиционные методы скарификации и обрезания, подвергаются риску, если они используют или

повторно используют нестерилизованные инструменты.

Согласно оценкам ВОЗ, около 170 миллионов человек, составляющих 3% населения мира, инфицированы гепатитом С и подвержены риску развития цирроза печени и/или рака печени. Распространенность инфекции гепатита С в некоторых странах Африки, Восточного Средиземноморья, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана (когда имеются данные о распространенности) является высокой, по сравнению с некоторыми странами Северной Америки и Европы.

Диагностические тесты для гепатита С используются для предотвращения заражения путем скрининга донорской крови и плазмы, установления клинического диагноза и принятия более эффективных решений в отношении медицинского лечения пациента. Диагностические тесты, имеющиеся в продаже сегодня, основаны на иммуноферментных анализах (EIA) для выявления специфических антител к гепатиту С. EIA могут обнаруживать более 95% хронически инфицированных пациентов, но могут обнаруживать только от 50% до 70% острых инфекций. Рекомбинантный иммуноблот-анализ (RIBA), который идентифицирует антитела, которые реагируют с отдельными антигенами гепатита С, часто используется в качестве дополнительного теста для подтверждения положительного результата EIA. Тестирование на гепатит С, циркулирующее с помощью тестов амплификации РНК (например, полимеразная цепная реакция или ПЦР, анализ разветвленной ДНК) также используется для подтверждения серологических результатов, а также для оценки эффективности противовирусной терапии. Положительный результат указывает на наличие активной инфекции и потенциал распространения инфекции, и/или развитие хронического заболевания печени.

Противовирусные препараты, такие как интерферон, взятые отдельно или в сочетании с рибавирином, могут использоваться для лечения пациентов с хроническим гепатитом С, но стоимость лечения является очень высокой. Лечение только интерфероном эффективно примерно у 10-20% пациентов. Интерферон, в сочетании с рибавирином, эффективен примерно у 30-50% пациентов. Рибавирин, по всей видимости, не является эффективным, если используется в одиночку.

Вакцины против гепатита С отсутствуют. Исследования ведутся, но высокая изменчивость генома гепатита С усложняет развитие вакцины. Отсутствие знаний о любом защитном иммунном ответе после инфицирования гепатитом С также препятствует проведению исследований вакцин. При этом неизвестно, способна ли иммунная система устранить вирус.

Однако, некоторые исследования продемонстрировали наличие антител,

нейтрализующих вирус у пациентов с гепатитом С-инфекцией. В отсутствие вакцины необходимо принять все меры предосторожности для предотвращения инфекции, включая (а) скрининг и тестирование доноров крови и органов; (б) инактивация вируса в продуктах, полученных из плазмы; (с) внедрение и поддержание практики инфекционного контроля в медицинских учреждениях, включая соответствующую стерилизацию медицинского и стоматологического оборудования; (d) содействие изменению поведения среди широкой общественности и работников здравоохранения с целью сокращения чрезмерного использования инъекций и использования безопасных методов инъекций; и (е) консультирование по вопросам снижения риска для лиц с высоким риском, употребляющих наркотики и ведущие небезопасную сексуальную жизнь».

Геном кодирует структурные компоненты, нуклеокапсидный белок и два огибающих гликопротеина, а также функциональные компоненты, участвующие в репликации вируса и обработке белка. Регионы, кодирующие нуклеокапсид, являются наиболее консервативными среди изолятов, полученных во всем мире.

С. ПРИНЦИП ИСПЫТАНИЯ

Микропланшеты покрыты гепатит С-специфическими антигенами, полученными из областей «core» и «p24», кодирующих консервативные и иммунодоминантные антигенные детерминанты (пептид ядра, рекомбинантные NS3, NS4 и NS5-пептиды).

Твердую фазу сначала обрабатывают разбавленным образцом, и гепатит С Ab захватывается, если он присутствует, с помощью антигенов. После вымывания всех других компонентов образца, во 2-й инкубации связываются антитела к гепатиту С, IgG и IgM, а также они обнаруживаются путем добавления поликлональных специфических антител против hIgG & M, меченных пероксидазой (HRP).

Фермент, захваченный на твердой фазе, действующий на субстратную смесь ТМВ, генерирует оптический сигнал, который пропорционален количеству антител против гепатита С, присутствующих в образце. Урезанное значение отсечки позволяет интерпретировать оптические плотности антитела к гепатиту С отрицательным и положительным результатам.

D. КОМПОНЕНТЫ

В комплект входят реагенты для 96 тестов (код 071067), 192 теста (код 071064) или 480 тестов (код 071068).

Микропланшет	1
Отрицательный контроль	1x4 мл/флакон
Положительный контроль	1x2 мл/флакон
Калибратор	2 флакона
Концентрат промывочного буферного раствора 20x	1x50 мл/флакон
Конъюгат	1x16 мл/флакон
Раствор для разбавления образца	1x50 мл/флакон
Субстрат ТМВ	1x16 мл/флакон
Стоп раствор	1x15 мл/флакон
Оценочный разбавитель	1x8 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	2
Количество тестов	96
Код	071067

Микропланшет	2
Отрицательный контроль	2x4 мл/флакон
Положительный контроль	1x4 мл/флакон
Калибратор	3 флакона
Концентрат промывочного буферного раствора 20x	2x50 мл/флаконы
Конъюгат	2x16 мл/флаконы
Раствор для разбавления образца	2x50 мл/флаконы
Субстрат ТМВ	2x16 мл/флаконы
Стоп раствор	2x15 мл/флаконы
Оценочный разбавитель	2x8 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	4
Количество тестов	192
Код	071064

Микропланшет	5
Отрицательный контроль	1x20 мл/флакон
Положительный контроль	1x10 мл/флакон
Калибратор	7 флаконов
Концентрат промывочного буферного раствора 20x	5x50 мл/флаконы
Конъюгат	2x40 мл/флаконы
Раствор для разбавления образца	5x50 мл/флаконы
Субстрат ТМВ	2x40 мл/флаконы
Стоп раствор	2x40 мл/флаконы
Оценочный разбавитель	1x40 мл/флакон
Фольгированная пленка для герметизации планшета	10
Количество тестов	480
Код	071068

1. Микропланшет

12 стрипов по 8 лунок покрыты пептидом ядра, рекомбинантными пептидами NS3, NS4 и NS5. Планшет запечатывали в алюминиевый пакет с осушителем.

Микропланшет доводят до комнатной температуры (+18...24°C) перед вскрытием пакета. Неиспользованные стрипы подлежат возврату в пакет, а пакет подлежит обратному запечатыванию и хранению при +2...8°C, в присутствии осушителя.

2. Отрицательный контроль

Контрольный раствор готов к использованию. Содержит 10 мМ Na-цитратного буферного раствора с уровнем pH 6,0±0,1, 2% казеина в качестве белковой основы и 0,1% Proclin 150 в качестве консерванта. Отрицательный контроль имеет оливково-зеленый цвет.

3. Положительный контроль

Контрольный раствор готов к использованию. Содержит 1% белков сыворотки козы, антитела человека к гепатиту С, 10 мМ Na-цитратного буферного раствора с уровнем pH 6,0±0,1, 0,5% Tween 20, 0,09% азида натрия и 0,1% Proclin 150 в качестве консервантов. Положительный контроль имеет темно-зеленый цвет.

Важное примечание. *Отсутствие жизнеспособных патогенов в позитивном контроле не может быть полностью обеспечено, и, следовательно, реагент следует обрабатывать как потенциально биологически опасный, в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.*

4. Калибратор

Лиюфилизированный калибратор. Растворить объемом воды класса EIA, указанной на этикетке. Вещество содержит белки фетальной бычьей сыворотки, человеческие антитела к гепатиту С, содержание которых откалибровано по стандарту NIBSC, 10 мМ Na-цитратный буфер pH 6,0±0.1, 0,3 мг/мл сульфата гентамицина и 0,1% Proclin 150 в качестве консервантов.

Важное примечание. *Отсутствие жизнеспособных патогенов в калибраторе не может быть полностью обеспечено, поэтому реагент следует обрабатывать как потенциально биологически опасный, в соответствии с надлежащей лабораторной практикой.*

Примечание: *Объем, необходимый для растворения содержимого флакона, может варьироваться в зависимости от партии. Пожалуйста, используйте правильный объем, указанный на этикетке.*

5. Концентрат промывочного буферного раствора 20x

20x – кратный концентрированный раствор. После разбавления промывочный раствор (разбавленный промывочный буферный раствор) содержит 10 мМ фосфатного буфера с уровнем pH 7.0 ± 0.2, 0.05% Tween 20 и 0.05% Proclin 150.

После разбавления промывочный раствор стабилен в течение 1 недели при температуре хранения +2...8°C.

6. Конъюгат

Готовый к использованию кодированный реагент красного цвета. Содержит конъюгированные пероксидазой хрена поликлональные козы антитела, к человеческим антителам IgG и IgM, 5% бычьего сывороточного альбумина, 10 мМ цитратного буфера с pH 6.4±0.1, 0.1% Proclin 150 и 0,05% Tween 20 в качестве консервантов.

7. Субстрат TMB

Готовый компонент. Содержит 50 мМ цитратно-фосфатного буфера с рН 3.5-3.8, 4% диметилсульфоксида, 0.03% тетраметилбензидина (TMB) и 0.02% перекиси водорода (H₂O₂). Перед использованием осторожно перемешать.

Примечание: Хранить в защищенном от света месте, т.к. препарат чувствителен к яркому освещению.

8. Аналитический разбавитель

Готовый компонент. Содержит козью сыворотку, 10 мМ трис-буферный раствор с рН 8.0±0.1, содержащий 0.1% Proclin 150 и 0.09% азида натрия, для предварительной обработки образцов и контролей в планшете, блокируя интерференцию.

9. Стоп раствор

Готовый компонент. Раствор содержит 0,3 М раствора H₂SO₄. Перед использованием осторожно перемешать.

10. Разбавитель образца

Готовый к использованию компонент, имеет темно-зеленый цвет. Он содержит 1% казеина, 10 мМ Na-цитратного буфера с уровнем рН 6,0 ± 0,1 и 0,1% Proclin 150 в качестве консерванта. Используется для разбавления образца.

Примечание: в присутствии образца разбавитель изменяет цвет от оливкового зеленого до темно-голубовато-зеленого.

Е. ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Калиброванные микропипетки (200 мкл и 10 мкл) и одноразовые пластиковые наконечники.
2. Вода класса EIA (бидистиллированная или деионизированная, обрабатывается углем для удаления окислительных химикатов, используемых в качестве дезинфицирующих средств).
3. Таймер с диапазоном 60 минут или выше.
4. Абсорбирующие бумажные ткани.
5. Калиброванный термостатический инкубатор с микропланшетами ELISA, способный обеспечивать температуру + 37°C.
6. Калиброванный считыватель микроячеек ELISA с 450 нм (чтение) и, возможно, с фильтрами 620-630 нм (гашение).
7. Калиброванный микропланшет ELISA.
8. Вихревые или аналогичные смесительные инструменты.

Ф. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор должен использоваться только квалифицированным и надлежащим образом подготовленным техническим персоналом, под наблюдением врача, отвечающего за лабораторию.
Вкладыш в упаковке необходимо внимательно прочитать перед использованием продукта.
2. Перед использованием продукта, внимательно прочтите Паспорт безопасности (ПБ).

3. Когда набор используется для скрининга единиц крови и компонентов крови, он должен использоваться в лаборатории, сертифицированной и соответствующей национальным органом в этой области (министерство здравоохранения или аналогичная организация) для проведения такого рода анализа.
4. Весь персонал, участвующий в проведении анализа, должен носить защитную лабораторную одежду, не содержащие тальк перчатки и очки. Следует избегать использования любых острых (игольчатых) или режущих (снабженных лезвиями) устройств. Весь персонал должен быть обучен процедурам биобезопасности, которые были рекомендованы Центром по контролю за заболеваниями, Атланта, США, и сообщается в публикации Национального института здравоохранения: «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях», под ред. 1984.
5. Весь персонал, занимающийся обработкой образцов, должен быть вакцинирован против HBV и HAV, для которых доступны безопасные и эффективные вакцины.
6. Лабораторную среду следует контролировать таким образом, чтобы избежать загрязнения, например, от пыли или микроорганизмов, возникающих при вдыхании воздуха, при открытии флаконов и микропланштов и при проведении теста. Защитите подложку (TMB) от воздействия сильного света и избегайте вибрации поверхности рабочего стола, на котором проводится испытание.
7. После получения, храните комплект при температуре +2...8°C в холодильнике с регулируемой температурой или в холодной комнате.
8. Не меняйте компоненты между различными партиями наборов. Рекомендуются, чтобы компоненты между двумя наборами одного и того же лота не заменялись.
9. Убедитесь в том, что реагенты чистые и не содержат видимых тяжелых частиц или агрегатов. Если нет, посоветуйте начальнику лаборатории инициировать необходимые процедуры замены набора.
10. Избегайте перекрестного заражения между образцами сыворотки/плазмы, используя одноразовые наконечники и меняя их после каждого образца.
11. Избегайте перекрестного заражения между реагентами набора, используя одноразовые наконечники и меняя их между использованием каждого из них.
12. Не используйте комплект после истечения срока годности, указанного на внешнем контейнере и внутренних этикетках (флаконах).
13. Необходимо обрабатывать все образцы как потенциально инфицированные. Все образцы человеческой сыворотки должны быть обработаны на уровне биобезопасности 2, согласно рекомендациям Центра по контролю за заболеваниями, Атланта, США, а также в соответствии с опубликованной информацией в

«Институте здравоохранения»: «Биобезопасность в микробиологических и биомедицинских лабораториях», изд. 1984.

14. При подготовке жидких компонентов или при переносе компонентов в автоматизированные рабочие места, во избежание перекрестного загрязнения, рекомендуется использование одноразовой пластиковой посуды.
15. Отходы, образующиеся при использовании набора, должны быть утилизированы в соответствии с национальными директивами и законами, касающимися лабораторных отходов химических и биологических веществ. В частности, жидкие отходы, образующиеся в процессе промывки и из остатков контролей и из образцов, должны рассматриваться как потенциально инфекционные материалы и инактивированы перед утилизацией. Предлагаемые процедуры инаktivации - обработка 10% конечной концентрацией бытового отбеливателя в течение 16-18 часов или инаktivации тепла автоклавом при 121°C, в течение 20 мин.
16. Случайные проливы образцов, во время проведения манипуляций, должны адсорбироваться бумажными тканями, пропитанными домашним отбеливателем, а затем водой. Затем ткани следует утилизировать в надлежащих контейнерах, предназначенных для лабораторных/больничных отходов.
17. Стоп раствор содержит 0,3 М серной кислоты. Необходимо избегать попадания на кожу и глаза. В случае контакта, немедленно промыть большим количеством воды.
18. Утилизируйте растворы реагентов, содержащие азид натрия, в качестве консервантов в соответствии со всеми местными, государственными и национальными правилами. Для утилизации реагентов, содержащих азид, промойте их обильным количеством воды. Утилизируйте с осторожностью, так как азид натрия может образовывать взрывоопасные соединения при длительном контакте с свинцовым или медным трубопроводом.
19. Не курить, не есть, не пить или не применять косметику в местах, где обрабатываются образцы или реагенты набора
20. Другие отходы, полученные при использовании набора (пример: наконечники, используемые для образцов и контролей, использованные микропланшеты), должны обрабатываться как потенциально инфицированные и утилизироваться в соответствии с национальными директивами и законами, касающимися лабораторных отходов.
21. Не пипетируйте ртом.

G. ОБРАЗЕЦ: ПОДГОТОВКА И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Кровь отбирается асептически с помощью венопункции, а плазму или сыворотку получают с использованием стандартных методов приготовления образцов для клинического лабораторного анализа. При этом какое-либо влияние на приготовление образца с цитратом, ЭДТА и гепарином не наблюдалось.

2. Избегайте добавления консервантов в образцы; особенно азид натрия, поскольку это химическое вещество влияет на ферментативную активность конъюгата, создавая ложные отрицательные результаты.
3. Образцы должны быть четко идентифицированы с кодами или названиями, чтобы избежать неправильной интерпретации результатов. Если набор используется для скрининга единиц крови, настоятельно рекомендуется маркировка в виде штрихового кода для электронного считывания.
4. Гемолизированные (красные) и очевидно гиперлипемические («молочные») образцы должны быть отклонены, поскольку они способны генерировать ложные результаты. Образцы, содержащие остатки фибрина, тяжелых частиц или микробных нитей и фракций, должны быть отклонены, поскольку они могут привести к ложным результатам.
5. Сыворотку и плазму можно хранить при температуре +2...8°C в течение пяти дней после забора. В течение более длительного периода хранения образцы могут храниться в замороженном состоянии при -20°C в течение нескольких месяцев. Любые замороженные образцы не должны быть заморожены/разморожены более одного раза, так как это может привести к образованию частиц, которые могут повлиять на результат теста.
6. Если присутствуют частицы, центрифугируйте при 2.000 об/мин в течение 20 минут или фильтруйте с использованием фильтров 0,2-0,8µ для очистки образца для тестирования.

H. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

В исследовании, проведенном на вскрытом комплекте, не было отмечено какой-либо существенной потери активности до 1 повторного использования комплекта и до 6 месяцев.

1. Микропланшеты:

Дайте микропланшету достичь комнатной температуры (около 1 часа), прежде чем вскрывать пакет. Убедитесь в том, что осушитель не приобрел темно-зеленый цвет, что указывает на дефект в производстве. В этом случае позвоните в службу поддержки Adaltis.

Неиспользованные полоски должны быть помещены обратно внутрь алюминиевого пакета вместе с влагопоглотителем, надежно застегнутым молнией и хранящимся при +2...8°C. После первого открытия оставшиеся полосы устойчивы до тех пор, пока индикатор влажности внутри пакета осушителя не станет желтым и зеленым.

2. Отрицательный контроль:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо взболтайте, методом встряхивания.

3. Положительный контрольный раствор:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания. Обращайтесь с этим компонентом как потенциально инфицированным.

4. Калибратор:

Тщательно растворите содержимое лиофилизированного флакона в объеме воды класса EIA, указанной на его этикетке. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

Обращайтесь с этим компонентом как потенциально инфицированным.

Примечание: при растворении калибратор нестабилен. Хранить в аликвотах при -20°C.

5. Концентрат промывочного буферного раствора 20x (флакон 50 мл):

Все содержимое 20-кратного концентрированного раствора должно быть разбавлено водой класса EIA до 1000 мл (объем указан на этикетке) и перед использованием хорошенько перемешать, встряхивая и держа флакон горизонтально. Поскольку некоторые кристаллы соли могут присутствовать во флаконе, позаботьтесь о растворении всего содержимого при приготовлении раствора. Во время подготовки избегать вспенивания, поскольку присутствие пузырьков может повлиять на эффективность циклов промывки.

Примечание: после разбавления промывочный раствор стабилен в течение 1 недели при температуре +2...8°C.

6. Конъюгат:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте методом встряхивания.

Соблюдайте осторожность, чтобы не загрязнять жидкость окисляющими химикатами, пылью или микробами, перемещаемыми по воздуху. Если этот компонент должен быть перенесен, используйте только пластиковые, и по возможности, стерильные одноразовые контейнеры.

7. Субстрат ТМВ:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания. Избегайте загрязнения жидкости окислителями, пылью или микробами. Не подвергайте воздействию сильного освещения, окислителей и металлических поверхностей. Если этот компонент должен быть перенесен, используйте только пластиковый и, если возможно, стерильный одноразовый контейнер.

8. Разбавитель для анализа:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

9. Стоп раствор:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

10. Разбавитель образца:

Готов к использованию. Перед использованием хорошо перемешайте путем встряхивания.

I. ПРИБОРЫ И ИНСТРУМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В СОЧЕТАНИИ С КОМПЛЕКТОМ

1. Микропипетки должны быть откалиброваны таким образом, чтобы вливать правильный объем, необходимый для анализа, а также должны представляться на регулярной основе на обеззараживание (бытовой спирт, 10%-ный раствор хлорной извести, дезинфицирующие средства больницы класса) из тех частей, которые могут случайно войти в контакт с образцом или компонентами набора. Их также следует регулярно подвергать обслуживанию, в целях демонстрации точности 1% и достоверности $\pm 2\%$. Также необходимо регулярно проводить дезактивацию разливов или остатков компонентов комплекта.
2. Инкубатор ELISA должен быть установлен на $+37^\circ\text{C}$ (допуск $\pm 0,5^\circ\text{C}$) и регулярно проверяться для обеспечения правильной температуры. Для инкубации подходят как сухие инкубаторы, так и водяные ванны, при условии, что прибор проверяется на инкубацию тестов ELISA.
3. Устройство для промывания ELISA чрезвычайно важно для общих характеристик анализа. Устройство для промывания должно быть тщательно проверено и правильно оптимизировано. Обычно для обеспечения выполнения анализ ожидаемыми методами, достаточно 4-5 циклов промывки (аспирация + диспенсация 350 мкл/на лунку промывочного раствора = 1 цикл). Предлагается время выдержки, составляющее 20-30 секунд между циклами. Чтобы правильно установить их количество, рекомендуется провести анализ с помощью элементов управления/калибратора набора и хорошо охарактеризованных отрицательных и положительных эталонных образцов, а также проверить, чтобы они соответствовали значениям, указанным ниже в разделах О «Внутреннем контроле качества». Регулярная калибровка поставляемых и поддерживаемых объемов (обеззараживание и чистка игл) с помощью промывочной установки, должна выполняться в соответствии с инструкциями производителя.
4. Допуск времени инкубации составляет $\pm 5\%$.
 - ✓ Метод короткой инкубации (для 1/2-го цикла инкубации между 43 мин до 47 мин, для 3-го цикла инкубации между 14 и 16 мин).
 - ✓ Стандартный метод инкубации (для 1-й инкубационной дозы от 57 мин до 63 мин, для 2-го и 3-го циклов инкубации между 29 и 31 мин).
5. Ридер микропланшетов ELISA должен быть оснащен фильтром для чтения 450 нм и в идеале со вторым фильтром (620-630 нм) для гашения целей. Его стандартными характеристиками должны включать (а) полосу пропускания ≤ 10 нм; (b) диапазон поглощения от 0 до $\geq 2,0$; (c) линейность до $\geq 2,0$; повторяемость $\geq 1\%$. Бланкирование проводят на лунках, указанных в разделе «Процедура анализа». Оптическая система считывателя должна регулярно калиброваться для обеспечения правильной оптической плотности. Его следует регулярно

технически обслуживать в соответствии с инструкциями производителя.

- При использовании автоматизированной рабочей станции ELISA все критические этапы (диспенсация, инкубация, промывка, считывание, встряхивание, обработка данных) должны быть тщательно настроены, откалиброваны, контролироваться и регулярно обслуживаться, чтобы соответствовать значениям, указанным в разделах О «Внутреннем качестве контрольного раствора». Протокол анализа должен быть установлен в операционной системе устройства и проверен как для промывочной установки, так и для считывателя. Кроме того, должна быть проверена правильная установка части для обработки жидкости (диспенсация и промывка). Особое внимание должно быть уделено избеганию переноса загрязнений с помощью игл, используемых для извлечения образцов и для промывки. Данные проблемы необходимо изучить и контролировать, чтобы свести к минимуму возможность загрязнения соседних лунок из-за сильно реактивных образцов, что способно привести к ложным положительным результатам.

L. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СРЕДСТВ КОНТРОЛЯ И МАНИПУЛЯЦИЙ

- Проверьте дату истечения срока действия набора, напечатанного на внешней этикетке коробки с комплектом. Не используйте, если срок годности комплекта истек.
- Убедитесь в том, что жидкие компоненты не загрязнены видимыми частицами или наполнителями невооруженным глазом. Убедитесь в том, что субстрат ТМВ бесцветный или бледно-голубой, аспирируя его небольшим объемом с помощью стерильной прозрачной пластиковой пипетки. Убедитесь в том, что при транспортировке не произошел поломка, и в коробке отсутствует утечка жидкости. Убедитесь в том, что алюминиевый пакет, содержащий микропланшет, не проколот или не поврежден.
- Разбавьте все содержимое 20х концентрированного промывочного буфера, как описано выше.
- Растворите калибратор, как описано выше.
- Дайте всем остальным компонентам достичь комнатной температуры (около 1 часа) и затем перемешайте, как описано выше.
- Установите инкубатор ELISA при температуре +37°C и подготовьте промывочную установку ELISA, заправляя разбавленным промывочным раствором в соответствии с инструкциями производителя. Установите правильное количество циклов промывки, как показано в разделе I.3.
- Убедитесь в том, что ридер ELISA включен не менее чем за 20 минут до считывания.
- Если вы используете автоматическую рабочую станцию, включите ее, проверьте настройки и убедитесь, что используете правильный протокол анализа.
- Убедитесь в том, что микропипетки установлены на требуемый объем.

10. Убедитесь в том, что все другое оборудование доступно и готово к использованию.

11. В случае проблем не продолжайте тестирование и не проконсультируйтесь с руководителем.

M. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

Анализ должен проводиться в соответствии с данными, приведенными ниже, в целях поддержания такого же времени инкубации для всех образцов при тестировании.

Процедуру анализа можно проводить с помощью двукратных инкубационных процедур. Выберите ту процедуру, которую требуется выполнить по вашему правилу:

- Стандартная инкубация (1-я инкубация 60 минут, 2-я и 3-я инкубация 30 минут)
- Короткая инкубация (1-я и 2-я инкубация 45 минут, 3-я инкубация - 15 минут)

1. Стандартная инкубация. Ручной анализ:

- Поместите необходимое количество микролунок в держатель микролунок. Оставьте 1-ю лунку пустой для манипуляции гашения.
- Внесите 200 мкл отрицательного контроля в трех повторениях, 200 мкл калибратора в двух экземплярах и 200 мкл положительного контроля в одиночном цикле в надлежащих лунках. Не разбавляйте элементы управления и калибратора, поскольку они предварительно разбавлены, и готовы к использованию!
- Добавьте 200 мкл разбавителя образца во все образцы лунок; затем распределите 10 мкл образца в каждой правильно идентифицированной лунке. Аккуратно перемешайте пластину, избегая переполнения и загрязнения соседних лунок, чтобы полностью диспергировать образец в его разбавителе.

Важное примечание: Убедитесь в том, что цвет разбавителя образца при добавлении образца изменяется от светло-зеленого до темно-синеватого зеленого цвета, таким образом контролируя действительное добавление образца.

- Распределите 50 мкл анализируемого разбавителя во все контрольные/калибраторные и лунки для образцов. Убедитесь в том, что цвет образцов превратился в темно-синий.
- Инкубируйте микропланшет в течение **60 минут при температуре +37°C**. Важное примечание. Полоски должны быть запечатаны с помощью клейкой уплотнительной фольги, наносимой только тогда, когда испытание проводится вручную. Не наносите полоски при использовании автоматических инструментов ELISA.
- Промойте микропланшет с помощью автоматической промывочной установки путем подачи и аспирации 350 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора, как сообщается в разделе I.3.
- Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, за исключением 1-й гасительной лунки, и накройте герметичной пленкой. Убедитесь в том, что красный компонент окрасил все лунки, кроме A1.

Важное примечание: Будьте осторожны, не дотрагивайтесь до пластиковой внутренней поверхности лунки кончиком, заполненным ферментным конъюгатом, так как может возникнуть загрязнение.

8. Инкубируйте микропланшет в течение **30 мин при температуре +37°C**.
9. Промойте микролунки, как указано в разделе I.3.
10. Внесите 100 мкл смеси субстрата ТМВ в каждую лунку, включите пустую лунку. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (+18...24°C) в течение **30 минут**.

Важное примечание: Не подвергайте микропланшет сильному прямому освещению, так как может быть создан высокий фон.

11. Внесите 100 мкл стоп-раствора во все лунки, используя ту же последовательность пипетирования, что и на этапе 10, чтобы остановить ферментативную реакцию. Добавление стоп-раствора приведет к положительному контролю и положительным образцам от синего до желтого.
12. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке, как описано в разделе I.5, при использовании 450 нм фильтра (чтение) и, возможно, на 620-630 нм (вычитание фона), с помощью гасящего инструмента на A1.

Важные примечания:

1. Если второй фильтр недоступен, убедитесь в том, что на нижней панели микросхемы нет отпечатков пальцев до считывания при 450 нм. Отпечатки пальцев могут генерировать ложные положительные результаты при чтении.
2. Чтение идеально должно выполняться сразу после добавления остановочного раствора, но, безусловно, не более чем через 20 минут после добавления. Может происходить некоторое самоокисление субстрата, что приводит к более высокому фону.
3. Было доказано, что встряхивание при 350 ± 150 об/мин во время инкубации повышает чувствительность анализа около 20%.

2. Короткая инкубация. Ручной анализ:

1. Поместите необходимое количество микроволн в держатель микроячейки. Оставьте 1-ю лунку пустой для операции гашения.
2. Внесите 200 мкл отрицательного контроля в трех повторениях, 200 мкл калибратора в двух экземплярах и 200 мкл положительного контроля в одиночной соответствующей лунке. Не разбавляйте элементы управления и калибратора, поскольку они предварительно разбавлены, готовы к использованию!
3. Добавьте 200 мкл разбавителя образца во все образцы лунок; затем распределите 10 мкл образца в каждой правильно идентифицированной скважине. Аккуратно перемешайте пластину, избегая переполнения и

загрязнения соседних лунок, чтобы полностью диспергировать образец в его разбавителе.

Важное примечание: Убедитесь в том, что цвет разбавителя образца при добавлении образца изменяется от светло-зеленого до темно-синеватого зеленого цвета, контролируя, что образец действительно добавлен.

4. Распределите 50 мкл анализируемого разбавителя во все контрольные/калибраторные и лунки для образцов. Убедитесь в том, что цвет образцов превратился в темно-синий.
5. Инкубируйте микропланшет в течение 45 минут при температуре +37°C. Важное примечание. Полоски должны быть запечатаны с помощью клейкой уплотнительной фольги, поставляемой только тогда, когда испытание проводится вручную. Не закрывайте полоски при использовании автоматических инструментов ELISA.
6. Промойте микропланшет с помощью автоматической промывочной установки путем подачи и аспирации 350 мкл/лунку разбавленного промывочного раствора, как указано в разделе I.3.
7. Внесите 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку, за исключением 1-й гасительной лунки, и накройте герметичной пленкой. Убедитесь в том, что красный компонент окрасил все лунки, кроме A1.

Важное примечание: Будьте осторожны, не дотрагивайтесь до пластиковой внутренней поверхности лунки кончиком, заполненным ферментным конъюгатом. Может возникнуть загрязнение.

8. Инкубируйте микропланшет в течение **45 минут при температуре + 37°C**.
9. Вымойте микролунки, как указано в разделе I.3.
10. Внесите 100 мкл смеси субстрата ТМВ в каждую лунку, включите пустую лунку. Затем инкубируйте микропланшет при комнатной температуре (+18...24°C) в течение **15 минут**.

Важное примечание: Не подвергайте микропланшет сильному воздействию прямых солнечных лучей, так как может быть создан высокий фон.

11. Внесите 100 мкл стоп-раствора во все лунки, используя ту же последовательность пипетирования, что и в шаге 10, чтобы остановить ферментативную реакцию. Добавление стоп-раствора приведет к положительному контролю и положительным образцам от синего до желтого.
12. Измерьте интенсивность цвета раствора в каждой лунке, как описано в разделе I.5, при 450 нм фильтре (считывание) и, возможно, при 620-630 нм (вычитание фона), бланшируя прибор на A1.

Важные примечания:

1. Если второй фильтр недоступен, убедитесь, что на нижней панели микросхемы нет отпечатков пальцев до считывания при 450 нм. Отпечатки пальцев могут генерировать ложные положительные результаты при чтении.
2. Чтение должно идеально выполняться сразу после добавления стоп-раствора, но, безусловно, не более чем через 20 минут после этого. Некоторое самоокисление субстрата может происходить, приводя к более высокому фону.
3. Было доказано, что встряхивание при 350 ± 150 об/мин во время инкубации повышает чувствительность анализа около 20%.

N. СХЕМА АНАЛИЗА

Метод	Операции (Стандартная инкубация)	Операции (Короткая инкубация)
Контрольные растворы и калибраторы	200 мкл	200 мкл
Образец разбавителя и образец	200 мкл разбавителя + 10 мкл образца	200 мкл разбавителя + 10 мкл образца
Разбавитель для анализа	50 мкл	50 мкл
1-я инкубация	60 мин (± 3)	45 мин (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Шаг промывки	4-5 циклов	4-5 циклов
Конъюгат фермента	100 мкл	100 мкл
2-я инкубация	30 мин (± 1)	45 мин (± 2)
Температура	+37°C	+37°C
Шаг промывки	4-5 циклов	4-5 циклов
Субстрат TMB	100 мкл	100 мкл
3-я инкубация	30 мин (± 1)	15 мин (± 1)
Температура	Комнатная температура (+18...24°C)	Комнатная температура (+18...24°C)
Стоп-раствор	100 мкл	100 мкл
Чтение OD	450/620	450/620

Пример схемы диспенсации приведен ниже (действителен для обеих процедур инкубационного времени):

Микропланшеты

	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										

Условные обозначения: BLK = пустой, NC = отрицательный контроль, CAL = калибратор PC = положительный контроль S = образец

O. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Проверка проводится на средства управления и калибраторе каждый раз, когда набор используется в целях проверки, с возможностью обеспечения соответствия их значения OD450/620nm, которые приведены в таблице ниже.

Проверка	Требования
Бланковый раствор в лунке	<0.100 OD 450/620nm значение
Отрицательный контроль (NC)	<0,050 среднее OD 450/620 нм после гашения
Калибратор	S/Co > 1,1
Положительный контроль	> 1.000 OD 450/620nm значение

Если результаты теста соответствуют указанным выше требованиям, перейдите к следующему разделу.

Если они не достигнут этих значений, не продолжайте и не выполняйте следующие проверки:

Проблемы	Проверки
Бланковый раствор в лунке > 0.100 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> 1. Проверьте отсутствие загрязнения раствора субстрата во время анализа.
Отрицательный контроль (NC) > 0,050 OD450nm после гашения	<ol style="list-style-type: none"> 1. Убедитесь в том, что процедура промывки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании; 2. Убедитесь в том, что был использован надлежащий моющий раствор, а устройство для промывания было заземлено перед использованием; 3. Убедитесь в том, что в процедуре анализа не было допущено ошибки (диспозиция положительного контроля вместо отрицательного раствора); 4. Убедитесь в том, что загрязнение отрицательного контроля или лунки, в которых проводился контроль, произошедшее из-за разливов положительных образцов или конъюгата фермента, отсутствует; 5. Убедитесь в том, что микропланшеты не загрязнены положительными образцами или конъюгатом фермента. 6. Убедитесь в том, что иглы промывочной установки не закупорились или частично не перекрываются.
Калибратор S/Co <1,1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Убедитесь в том, что процедура была выполнена правильно; 2. Убедитесь в том, что во время его распространения не произошло никакой ошибки (например, диспенсация отрицательного контроля вместо калибратора) 3. Убедитесь в том, что процедура промывки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании; 4. Убедитесь в том, что никакого внешнего загрязнения калибратора не произошло.

Положительный контроль <1.000 OD450nm	1. Убедитесь в том, что процедура была выполнена правильно;
	2. Убедитесь в том, что при распределении контроля не произошло никакой ошибки (диспенсация отрицательного контроля). В этом случае отрицательный контроль будет иметь значение OD450nm > 0.150.
	3. Убедитесь в том, что процедура мойки и настройки промывочной установки подтверждены в предварительном квалификационном исследовании;
	4. Убедитесь в том, что никакого внешнего загрязнения положительного контроля не произошло.

Если возникла какая-либо из вышеуказанных проблем, сообщите об этом руководителю для выполнения дальнейших действий.

Р. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты испытаний рассчитываются с помощью сокращенного значения, определенного по следующей формуле:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC среднее значение} + 0,350$$

Значение, найденное для теста, используется для интерпретации результатов, как описано в следующем параграфе.

Q. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты испытаний интерпретируются как отношение образца OD450nm и значения Cut-Off (или S/Co) в соответствии со следующей таблицей:

S/Co	Интерпретация
<0,9	Отрицательный
0,9 - 1,1	Сомнительный
> 1,1	Положительный

Отрицательный результат указывает на то, что пациент не был инфицирован гепатит С или что может быть проведено переливание крови. Любой пациент, у которого присутствует двусмысленный результат, должен снова тестироваться на втором образце, взятом через 1-2 недели у пациента и обследованных. При этом переливание с объема крови осуществляться не должно.

Положительный результат указывает на инфекцию гепатит С, и поэтому пациента следует лечить соответственно, или следует уничтожить данный объем крови.

Важные примечания:

- Интерпретация результатов должна проводиться под наблюдением ответственного за лабораторию, чтобы уменьшить риск ошибок и неверных истолкований.
- Любой положительный результат должен быть подтвержден альтернативным методом, способным обнаруживать антитела IgG и IgM (подтверждающий тест) до постановки диагноза вирусного гепатита.

- Как это было доказано в Оценке эффективности продукта, анализ способен обнаруживать сероконверсию к антигенам антителам к гепатит С раньше, чем некоторые другие коммерческие наборы. Поэтому положительный результат, не подтвержденный этими коммерческими наборами, не должен быть исключен как ложноположительный результат! Образец должен быть в любом случае отправлен на подтверждение.
- До тех пор, пока анализ способен обнаруживать также IgM-антитела, могут присутствовать некоторые несоответствующие результаты с другими коммерческими продуктами для обнаружения антител против гепатит С - без конъюгата относительно hIgM в рецептуре ферментного индикатора и, следовательно, отсутствия реактивности IgM. Реальная положительная реакция образца антител к гепатит С должна быть затем подтверждена путем подобного изучения реактивности IgM, важной для диагностики инфекции гепатит С.
- Когда результаты испытаний передаются из лаборатории в центр информатики, необходимо обратить внимание на избегание ошибочной передачи данных.
- Диагностика вирусной инфекции гепатита должна быть произведена и передана пациенту только квалифицированным врачом.

Ниже приведен пример расчета:

Следующие данные не должны использоваться вместо реальных цифр, полученных пользователем.

Отрицательный контроль: 0,019 - 0,020 - 0,021 OD450 nm

Среднее значение: 0,020 OD450nm Менее 0,050 - Принято

Положительный контроль: 2.189 OD450nm Более 1.000 - Принято

Сокращенные данные = 0,020 + 0,350 = 0,377

Калибратор: 0,550 - 0,530 OD450nm

Среднее значение: 0,540 OD450nm

S/Co = 1,4 S/Co выше 1,1 - Принято

Образец 1: 0,070 OD450 nm

Образец 2: 1,690 OD450 nm

Образец 1 S/Co <0,9 = отрицательный

Образец 2 S/Co > 1,1 = положительный

R. ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ

Оценка производительности была проведена в соответствии с условиями, приведенными в Общих технических спецификациях или CTS (статья 5, глава 3 Директивы 98/79/ЕС IVD) и в обеих процедурах инкубации (стандартной и короткой).

1. ОГРАНИЧЕНИЕ ОБНАРУЖЕНИЯ

Предел обнаружения анализа был рассчитан с использованием короткого анализа инкубации с помощью Британского рабочего стандарта для анти-

гепатит С, код NIBSC 06/188-006. В приведенной ниже таблице отображены средние значения OD450nm данного стандарта при разбавлении в отрицательной плазме и затем после анализа.

разбавление	Лот № 1	Лот № 2	Лот № 3
фактор	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
Отрицательная плазма	0,25	0,20	0,20

Кроме того, образец, с кодовым названием Accurun 1 – серии 3000, предоставленный компанией Boston Biomedica Inc., США, был оценен «целиком», а результаты приведены ниже:

Серии Accurun 1	Лот № 1	Лот № 2	Лот № 3
Фактор	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Оценка эффективности устройства проводилась в испытании, проведенном более чем на 5000 образцов.

2.1 Диагностическая специфичность

Диагностическая специфичность определяется как вероятность анализа подсчета отрицательных значений в отсутствие специфического аналитического раствора. Было обследовано в общей сложности более 5000 случайно отобранных доноров, включая доноров, привлеченных к исследованию впервые.

Диагностическая специфичность оценивалась касательно комплекта, утвержденного FDA США.

Была протестирована кровь 5043 доноров, обеспечивающих специфичность 99,5%. 210 госпитализированных пациентов были протестированы на гепатит С Ab; при этом была обнаружена диагностическая специфичность 99,5%. Более того, диагностическую специфичность оценивали путем тестирования 162 потенциально интерферирующих образцов (другие инфекционные заболевания, положительные антитела кишечной палочки, и пациенты, которые подверглись воздействию невирусных заболеваний печени, диализные пациенты, беременные женщины, гемолизированные, липемические пациенты и т. д.). Была оценена ценность специфичности в размере 100%.

При этом никакой ложной реактивности из-за метода подготовки образца не наблюдалось. Для определения значения специфичности использовались обе плазмы, полученные с использованием различных стандартных методов приготовления (цитрат, ЭДТА и гепарин) и сыворотки. Были проверены также замороженные образцы, чтобы проверить наличие помех из-за сбора и хранения. При этом никаких помех не наблюдалось.

2.2 Диагностическая чувствительность

Она определялась как вероятность анализа положительного результата подсчета в присутствии специфического аналитического раствора. Диагностическая чувствительность была оценена снаружи на общем количестве 348 экземпляров; диагностическая чувствительность составляла 100%. Внутри тестировались более 50 положительных образцов, в результате чего значение диагностической чувствительности снова составляло 100%. Были также проверены положительные образцы от инфекций, проводимых различными генотипами гепатит С.

Кроме того, было изучено большинство сероконверсионных панелей, доступных в Boston Biomedica Inc., USA, (PHV) и Zeptometrix, USA (гепатит С).

Результаты приведены ниже для некоторых из них.

Панель	Образцы N°	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
гепатит С 10039	5	2	0
гепатит С 6212	9	6	7
гепатит С 10165	9	5	4

Примечание:

1. Выявленные положительные образцы
2. гепатит С v.3.0

Наконец, продукт был протестирован на панели EFS Ac гепатит С, серия № 06.140817, поставляемой Etablissement Francais Du Sang (EFS), Франция, со следующими результатами:

EFS Панель Ас гепатит С

Образец	Лот № 1 S/Co	Лот № 2 S/Co	Лот № 3 S/Co	В среднем стоимость
гепатит С 1	0,53	0,52	0,55	отрицательный
гепатит С 2	3,28	5,91	3,04	положительный
гепатит С 3	2,17	3,18	2,56	положительный
гепатит С 4	2,26	2,23	2,35	положительный
гепатит С 5	6,10	7,06	6,90	положительный
гепатит С 6	1,66	1,77	1,67	положительный

3. ТОЧНОСТЬ

Точность была рассчитана по пяти выборкам, с одним отрицательным и четырьмя положительными результатами, рассмотренными в 4 повторения каждого из шести отдельных циклов. Точность, полученная для обоих протоколов, является эквивалентной.

Результаты представлены следующим образом:

Результаты внутри лота: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й лот (короткий инкубационный анализ)

Образец	S/Co Среднее	Точность -% CV		
		В пределах цикла	Между циклами	Всего
Отрицательный	0.03	6,66	10,56	12,48
Положительный	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

Результаты внутри лота: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й лот (длительный инкубационный анализ)

Образец	S/Co Среднее	Точность -% CV		
		В пределах цикла	Между циклами	Всего
Отрицательный	0.04	4,67	12,34	13,19
Положительный	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

Результаты Inter-lot: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit - 1-й, 2-й и 3-й лоты (короткий инкубационный анализ)

Образец	Точность -% CV		
	Лот 1	Лот 2	Лот 3
Отрицательный	8,65	8,29	6,13
Калибратор	4,98	4,44	5,38
Положительный	4,11	3,11	1,37

Изменчивость, показанная в вышеприведенных таблицах, не привела к ошибочной классификации образца.

S. ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПО УСТРАНЕНИЮ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Соблюдение процедуры и характеристик анализа, а также правильное использование реагентов и правильной пипетирование могут помочь избежать последующих ошибок.

ОШИБКА	ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ/ПРЕДЛОЖЕНИЯ
OD сильно отличаются ($\pm 50\%$) от OD, сообщенного по QC	<ul style="list-style-type: none"> -неправильный объем раскапывания реагентов (предложение: проверить соответствие между объемом, выдаваемым пипеткой, и объемом, необходимым для анализа, повторно откалибровать пипетки) -неправильная температура или неправильное время инкубации (предложение: больше внимания уделять для ухода за инкубатором, запишите время начала инкубации) -ошибка в промывке или при чтении фотометра (предложение: проверить работу или настройки соответствующих приборов) -загрязнение субстрата или конъюгата (предложение: использовать только одноразовые и чистые пластиковые контейнеры)
Низкая воспроизводимость результатов	<ul style="list-style-type: none"> -непостоянный объем дозирования образцов или реагентов (предположение: проверить точность пипеток и соответствие между объемом, выдаваемым пипеткой, и тем, который требуется для анализа, повторно откалибровать пипетки) -ошибка при промывке или чтении (предложение: проверьте работу или настройки соответствующих инструментов) - загрязнение субстрата (предположение: использовать только одноразовые и чистые пластиковые контейнеры) -загрязнение или деградация реагентов (предположение: используйте соответствующие наконечники, одноразовые и чистые пластиковые контейнеры для реагентов и высококачественной дистиллированной или эквивалентной воды)
Отсутствие колориметрической реакции после добавления субстрата	<ul style="list-style-type: none"> -не пипетирован какой-то реагент -сильное загрязнение конъюгата или субстрата -ошибки при выполнении процедуры анализа (например, случайное пипетирование реагентов в неправильной последовательности или из неправильного флакона, и т.д.)
слишком низкая реакция (слишком низкие OD)	<ul style="list-style-type: none"> -время инкубации слишком короткое, температура инкубации слишком низкая - правильное разведение конъюгата

слишком высокая реакция (слишком высокие OD)	<ul style="list-style-type: none"> -неправильное разведение конъюгата -слишком длительное время инкубации, слишком высокая температура инкубации -качество воды для промывочного буфера недостаточно (низкий уровень деионизации) -недостаточная промывка (конъюгаты не удалены должным образом)
необъяснимые выбросы	<ul style="list-style-type: none"> -загрязнение пипеток, наконечников или контейнеров - постоянная и недостаточная промывка (конъюгаты не удаляются должным образом)
слишком высокий внутренний CV%	<ul style="list-style-type: none"> -реагенты и/или полоски не были предварительно нагреты до комнатной температуры перед использованием - планшет в устройстве для промывания не промывается правильно (предложение: очистить устройство для промывания)
слишком высокий межоперационный CV%	<ul style="list-style-type: none"> -инкубационные условия не постоянны (время, температура) -контрольные образцы и образцы не выдаются одновременно (с одинаковыми интервалами) (проверьте порядок подачи пипетки), -человеческий фактор

T. АВТОМАТИЗАЦИЯ

Процедуры, указанные в настоящей Инструкции по применению, предназначены только для ручного тестирования. При использовании автоматических приборов, следуйте процедурам, содержащимся в руководстве оператора, предоставленном производителем устройства. Лаборатории должны следовать утвержденным процедурам проверки, чтобы продемонстрировать совместимость этого продукта с автоматизированными системами.

U. ОГРАНИЧЕНИЯ

Повторяющиеся ложноположительные результаты, не подтвержденные RIBA или аналогичные методы подтверждения, оценивались как менее 0,1% от нормальной популяции.

Наблюдались замороженные образцы, содержащие частицы фибрина или вещества после оттаивания, с получением ложных результатов.

СПРАВОЧНАЯ ЛИТЕРАТУРА

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. Fingerhood 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.

EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Ovo uputstvo se mora pažljivo pročitati pre upotrebe proizvoda.

Uputstva za izvođenje testa se moraju pažljivo pratiti.

Pouzdanost rezultata testa se ne može garantovati ukoliko ima odstupanja od datog uputstva.



Proizvođač:
Adaltis S.r.l
Via Durini, 27
20122 Milano (Italy)
Tel. +39-0774-5791 - Fax +39-0774-353085
www.adaltis.net

sr

SIMBOLI KOJI SE KORISTE NA NALEPNICAMA

Srpski SR							
	Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku	Kataloški broj	Broj lota	Pažnj, Vidi uputstva za upotrebu	Ograničenje temperature	Koristi	Broj testa
	Proizvođač	Držati dalje od sunčeve svetlosti	Datum izrade	Mikro-ploča	Sredstvo za pozitivnu kontrolul	Sredstvo za negativnu kontrolu	Kalibrator
	Konjugat	Diluent za uzorak	Supstrat TMB	Rastvor za zaustavljanje reakcije (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Pufer za pranje koncent. (20x)	Diluent za probu	Ponovo uspostaviti sa x mL
	Biološka opasnost	Opasnost	Upozorenje				

Pažnja:

Rastvor za zaustavljanje reakcije klasifikuje se kao: Nagrizajući za kožu. 1A



- **Reč koja označava signal:**
Opasnost
- **Označavanje komponenti opasnosti:**
Sumporna kiselina
- **Izjave o opasnosti:**
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- **Izjave o merama predostrožnosti:**
P260 Ne udisati prašinu/dim/gas/maglu/paru/raspršenu supstancu.
P303+P361+P353 AKO DOSPE NA KOŽU (ili kosu): Odmah svkinuti svu kontaminiranu odeć. Isprati kožu vodom/tušem.
P305+P351+P338 AKO DOSPE U OČI: Isprati oprezno vodom nekoliko minuta. Izvaditi kontaktna sočiva, ako ih ima, liako je to lako izvesti. Nastaviti ispiranje.
P310 Pozvati odmah CENTA ZA RAD SA OTVROVIMA/lekara.
P405 Držati zaključano.
P501 Sadržaj/kointejner odlagati u skladu sa lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim propisima.

Attention:

Sredstva za negativnu kontrolu, sredstva za pozitivnu kontrolu, sredstva za kalibrisanje, konjugat, diluents za uzorak, diluents za probu i 20X koncentrovani puffer za pranje klasifikuju se kao Senzitivizatori kože 1.



- **Reč koja označava simbol:**
Upozorenje
- **Označavanje komponenti opasnosti:**
Reakciona masa 5-hloro-2-metill-4-izotiazolina-3-jedan [EC no. 247-500-7] i 2-metil-2H-izotizola-3-jedan [EC br. 220-239-6] (3:1)
- **Izjave o opasnosti:**
H317 Može izazvati alergijsku reakciju na koži.
- **Izjave o merama predostrožnosti:**
P261 Izbegavagti udisanje prašine/dima/gasa/magle/pare/raspršene materije.
P280 Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odeću/štitnik za oči/štitnik za lice.
P321 Specifični tretman (vidi na ovoj nalepnici)
P333+P313 IAKO se javi nadržaj kože ili osip: Potražite medicinsku pomoć/pregled.
P302+P352 AKO DOSPE NA KOŽU: Oprati sa dosta vode.
P501 Sadržaj/kontejner odlagati u skladu sa lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim propisima.

Za Liste sa podacima o bezbednosti pogledajte www.adaltis.net.

A. NAMENA

Imunoenzimski (ELISA) test četvrte generacije za određivanje antitela na virus hepatitisa C u humanom serumu i plazmi (EDTA, heparin i citrat). Test se može koristiti za skrining jedinica krvi na HCV-inficirane pacijenate.

Isključivo za "in vitro" dijagnostički upotrebu.

B. UVOD

Svetska zdravstvena organizacija (WHO) definiše hepatitis C infekcije na sledeći način:

Do otkrivanja uzročnog agensa 1989. god., hepatitis C, virusna infekcija jetre, je opisivana kao parenteralno prenosiv "ne A, ne B hepatitis". Otkrivanje i karakterizacija hepatitisa C virusa (HCV) doveli su do razumevanja njegove primarne uloge u post transfuzijskom hepatitisu i njegove sklonosti da prouzrokuje trajnu infekciju.

HCV je glavni uzročnik akutnog hepatitisa i hronične bolesti jetre, uključujući i cirozu i karcinom jetre. Globalno, procenjuje se da je oko 170 miliona osoba hronično zaraženo HCV-om i da je 3 do 4 miliona novoinficiranih osoba svake godine. HCV se prvenstveno prenosi direktnim kontaktom sa ljudskom krvlju. Glavni uzroci HCV infekcije širom sveta su korišćenje neproverenih transfuzija krvi, i ponovno korišćenje igala i špriceva koje nisu adekvatno sterilisani. Za sada nema vakcina za sprečavanje hepatitisa C, a lečenje hroničnog hepatitisa C je preskupo za većinu ljudi u zemljama u razvoju. Dakle, iz globalne perspektive, najveći uticaj na hepatitis C zdravstveni budžet verovatno će se postići fokusiranjem napora na smanjenju rizika od HCV infekcije pri intrahospitalnoj izloženosti (npr. transfuzija krvi, praksa nebezbedne injekcije) i rizičnom ponašanju (npr. ubrizgavanje droge).

Hepatitis C virus (HCV) je jedan od virusa (A, B, C, D i E), koji zajedno čine veliku većinu slučajeva virusnog hepatitisa. Hepatitis C virus (HCV) je RNA virus iz porodice flaviviridae, koji izgleda ima uzak spektar domaćina. Ljudi i šimpanze su jedine poznate vrste osetljive na infekcije, sa sličnim razvojem bolesti. Važna karakteristika virusa je relativna promenljivosti njegovog genoma, što je verovatno razlog velike sklonosti (80%) za hroničnu infekciju. HCV je klasifikovan u nekoliko različitih genotipova koji mogu biti važni u određivanju težine bolesti i odgovora na terapiju.

Period inkubacije HCV infekcije do pojave kliničkih simptoma kreće se od 15 do 150 dana. Kod akutnih infekcija, najčešći simptomi su umor i žutica, međutim, u većini slučajeva (između 60% i 70%), čak i oni koje razvijaju hroničnu infekciju, su simptomatski. Kod oko 80% novo zaraženih pacijenata dolazi do razvoja hronične infekcije. Ciroza se razvija kod 10% do 20% osoba sa hroničnom infekcijom, a karcinom jetre kod 1% do 5% osoba sa hroničnom infekcijom tokom perioda od 20 do 30 godine. Većina pacijenata koji boluju od karcinoma jetre, koji se nemaju hepatitis B infekciju, imaju dokaze o HCV infekciji. Mehanizmi kojim HCV infekcija dovodi do karcinoma jetre i dalje nije jasan.

Hepatitis C takođe povećava težinu osnovne bolesti jetre, kada koegzistira sa drugim hepatičnim stanjima. Konkretno, bolest jetre napreduje brže kod osoba sa alkoholnom bolesti jetre i HCV infekcijom. HCV se prvenstveno prenosi direktnim kontaktom sa ljudskom krvlju. Transmisija preko transfuzije krvi koja nije testirana na HCV infekciju, upotrebom neadekvatno sterilisanih igala, špriceva ili druge medicinske opreme, ili preko igle razmenjene između korisnika droge, dobro je dokumentovana. Seksualni i perinatalni prenos su takođe mogući, iako ređe. Mogući su i drugi oblici prenosa, kao što su društvene, kulturne, i običajne prakse koje koriste perkutanu proceduru (npr. pirsing uha i tela, obrezivanje, tetoviranje) ako se koristi nedovoljno sterilisana oprema. HCV se ne prenosi kihanjem, grljenjem, kašljem, hranom ili vodom, priborom za jelo ili slučajnim kontaktom.

U razvijenim i zemljama u razvoju, u visoko rizične grupe spadaju intravenski korisnici droga, primaoci nekontrolisane krvi, hemofiličari, pacijenti na dijalizi i osobe sa više seksualnih partnera koji se upuštaju u seks bez zaštite. Procenjuje se da u razvijenim zemljama 90% osoba sa hroničnom HCV infekcijom čine sadašnji i bivši intravenski korisnici droga i one sa istorijom nekontrolisane transfuzije krvi ili krvnih derivata. U mnogim zemljama u razvoju, gde se i dalje koriste nekontrolisana krv i krvni proizvodi, glavni načini prenosa su nesterilisana oprema za ubrizgavanje i nekontrolisana transfuzija krvi. Osim toga, ljudi koji koriste tradicionalno stvaranje ožiljaka i praksu obrezivanja su u opasnosti ukoliko koriste već korišćenu ili nesterilisanu opremu.

Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da je oko 170 miliona ljudi, 3% svetske populacije zaraženo HCV-om, i da postoji rizik od razvoja ciroze jetre i/ili karcinoma jetre. Prevalenca infekcije HCV u nekim zemljama Afrike, istočnog Mediterana, jugoistočne Azije i zapadnog Pacifika (kada su dostupni podaci) je visoka u poređenju sa nekim zemljama Severne Amerike i Evrope.

Dijagnostički testovi za HCV se koriste za sprečavanje infekcija kroz skrining donorske krvi i plazme, za postavljanje kliničke dijagnoze i donošenje bolje odluke u vezi sa medicinskom obradom pacijenta. Dijagnostički testovi komercijalno dostupni danas, zasnivaju se na imunoenzimskim testovima (EIA) za detekciju HCV specifičnih antitela. EIA može da otkrije više od 95% hronično zaraženih pacijenata, ali može da otkrije samo 50% do 70% akutnih infekcija. Rekombinantni imunoblot test (RIBA) koji identifikuje antitela koja reaguju sa individualnim HCV antigenima često se koristi kao dodatni test za potvrdu EIA pozitivnih rezultata. Testiranje HCV amplifikacijom RNK (npr. lančana reakcija polimeraze ili PCR, razgranat DNK test) se takođe koristi za potvrdu seroloških rezultata, kao i za procenu efikasnosti antivirusne terapije. Pozitivan rezultat ukazuje na prisustvo aktivne infekcije i potencijal za širenje infekcije i/ili za razvoj hronične bolesti jetre.

Antivirusni lekovi kao što je interferon uziman sam ili u kombinaciji sa ribavirinom, mogu da se koriste za lečenje osoba sa hroničnim hepatitisom C, ali je cena lečenja veoma visoka. Terapija interferonom efikasna je samo kod 10% do 20% pacijenata. Interferon u kombinaciji sa ribavirinom je efikasan kod 30% do 50% pacijenata. Izgleda da ribavirin korišćen samostalno nije efikasan.

Ne postoji vakcina za HCV. Istraživanje je u toku, ali visoka promenljivosti HCV genoma komplikuje razvoj vakcine. Nedostatak znanja o nekom zaštitnom imuno odgovoru posle HCV infekcije takođe otežava istraživanje u vezi vakcine. Nije poznato da li je imunološki sistem u stanju da eliminiše virus.

Neke studije, međutim, pokazuju prisustvo virus neutrališućih antitela kod bolesnika sa HCV infekcijom. U odsustvu vakcine, moraju se preduzeti sve mere predostrožnosti da se spreči infekcija uključujući (a) skrining i testiranje davalaca krvi i organa, (b) inaktivacija virusa u proizvodima dobijenih iz plazme (c) implementaciju i održavanje kontrole infekcije u praksi zdravstvene zaštite i pružanju nege, uključujući i odgovarajuću sterilizaciju medicinske i stomatološke opreme, (d) promovisanje promene ponašanja u javnosti i među zdravstvenim radnicima da se smanje prekomerne injekcije i da se koristi bezbedna praksa ubrizgavanja i (e) smanjenje rizika savetovanjem osoba sa visokim rizikom među korisnicima droga i seksualne prakse.

Genom kodira strukturne komponente, nukleokapsidni protein i dva glikoproteina omotača i funkcionalne sastojke koji su uključeni u replikaciju virusa i obradu proteina. Nucleokapsidni kodirani region izgleda najkonzervativniji među izolatima širom sveta.

C. PRINCIP TESTA

Mikroploče su obložene HCV-specifičnim antigenima dobijenim od "jezgra" i "ns" regiona kodiranih za konzervativne i imunodominantne antigenske determinante (peptid jezgra, rekombinantni NS3, NS4 i NS5 peptidi).

Čvrsta faza se prvo tretira sa razblaženim uzorkom i HCV Ab se vezuju, ako su prisutna, za antigene. Posle ispiranja svih ostalih komponenti iz uzorka, u 2. inkubaciji vezana HCV antitela, IgG i IgM, se detektuju dodavanjem poliklonalnih specifičnih anti hlgG & M antitela, označenih peroksidazom (HRP).

Enzim zarobljen na čvrstoj fazi, deluje na supstratnu TMB mešavinu, generišući optički signal koji je proporcionalan količini anti HCV antitela prisutnih u uzorku. Cut-off vrednost (granična vrednost) omogućava da se optičke gustine tumače na HCV antitela negativne i pozitivne rezultate.

D. KOMPONENTE

Komplet sadrži reagense za 96 testova (broj 071067), 192 testa (broj 071064) ili 480 testova (broj 071068).

Mikroplača	1
Negativna kontrola	1x4 mL/bočici
Pozitivna kontrola	1x2 mL/bočici
Kalibrator	2 bočice
Pufer za pranje 20x	1x50 mL/bočici
Konjugat	1x16 mL/bočici
Diluent za uzorke	1x50 mL/bočici
Supstrat TMB	1x16 mL/bočici
Stop rastvor	1x15 mL/bočici
Test diluent	1x8 mL/bočici
Folija za pokrivanje ploče	2
Broj testova	96
Broj	071067

Microplate	2
Negative Control	2x4 mL/bočici
Positive Control	1x4 mL/bočici
Calibrator	3 bočice
Wash Buffer Concentrate 20x	2x50 mL/bočici
Conjugate	2x16 mL/bočici
Sample Diluent	2x50 mL/bočici
Substrate TMB	2x16 mL/bočici
Stop Solution	2x15 mL/bočici
Assay Diluent	2x8 mL/bočici
Plate sealing foils	4
Broj testova	192
Broj	071064

Microplate	5
Negative Control	1x20 mL/bočici
Positive Control	1x10 mL/bočici
Calibrator	7 bočica
Wash Buffer Concentrate 20x	5x50 mL/bočici
Conjugate	2x40 mL/bočici
Sample Diluent	5x50 mL/bočici
Substrate TMB	2x40 mL/bočici
Stop Solution	2x40 mL/bočici
Assay Diluent	1x40 mL/bočici
Plate sealing foils	10
Broj testova	480
Broj	071068

1. Mikroplača

12 stripova sa 8 mikročašica obloženih peptidom jezgra, rekombinantnim NS3, NS4 i NS5 peptidima. Ploče su hermetički zatvorene u aluminijumskoj kesi sa desikantom. Dovedi mikroplaču do sobne temperature (+18...24°C) pre otvaranja kese. Neupotrebljene stripove vratiti u aluminijumski omot sa desikantom, zatvoriti ga i čuvati na +2...8°C.

2. Negativna kontrola

Spremna za upotrebu. Sadrži 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1, 2% kazein kao proteinsku bazu i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Negativna kontrola je obojana maslinasto zeleno.

3. Pozitivna kontrola

Spreman za upotrebu. Sadrži 1% serumskih proteina koze, humana antitela na HCV, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% Na-azid i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Pozitivna kontrola je tamno zelene boje.

Važna napomena: *Nepostojanje održivih patogena u pozitivnoj kontroli ne može se u potpunosti obezbediti,*

zato, u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, reagens treba tretirati kao potencijalno biohazardni.

4. Kalibrator

Liofilizovan. Rastvoriti ga količinom vode EIA kvaliteta datoj na etiketi. Sadrži fetalne goveđe serumske proteine, humana antitela na HCV čiji je sadržaj kalibrisan u odnosu na NIBSC radni standard broj 06/188-006, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1 , 0.3 mg/mL gentamicin sulfata i 0.1% Proclean 150 kao konzervanse.

Važna napomena: *Nepostojanje održivih patogena u kalibratoru se ne može u potpunosti obezbediti, zato, u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom, reagens treba tretirati kao potencijalno biohazardni.*

Napomena: *Zapremina koja jepotrebna da se rastvori sadržaj bočice može varirati od lota do lota. Molimo Vas da koristite zapreminu koja je naznačena na nalepnici.*

5. Koncentrat pufera za pranje 20x

20x koncentrovani rastvor. Razblažen, rastvor za pranje sadrži 10 mM fosfatni pufer pH 7.0 ± 0.2 , 0.05% Tween 20 i 0.05% Proclean 150.

Nakon rastvaranja, rastvor za pranje je stabilan 1 nedelju na $+2...8^{\circ}\text{C}$.

6. Konjugat

Spreman za korišćenje, crveno obojen rastvor. Sadrži peroksidazom rena konjugovana poliklonalna antitela koze na humani IgG i IgM, 5% BSA, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.4 ± 0.1 , 0.1% Proclean, i 0.05% Tween 20 kao konzervanse.

7. Supstrat TMB

Spreman za korišćenje. Sadrži 50 mM citrat-fosfatni pufer pH 3.5-3.8, 4% dimetilsulfoksida, 0.03% tetra-metilbenzidina ili TMB i 0.02% vodonik peroksida ili H_2O_2 . Pomešati lagano pre upotrebe.

Napomena: *čuvati zaštićen od svetlosti.*

8. Test diluent

Spreman za korišćenje. Sadrži serum koze, 10 mM Tris puferisani rastvor pH 8.0 ± 0.1 sa 0.1% Proclean 150 i 0.09% Na azida za predtretman uzoraka i kontrole na ploči, blokira smetnje.

9. Stop rastvor

Spreman za korišćenje.

Sadrži rastvor 0.3 M H_2SO_4 . Pomešajti lagano pre upotrebe.

10. Diluent za uzorke

Spreman za korišćenje, tamno zeleno obojen rastvor. Sadrži 1% kazeina, 10 mM Na-citratni pufer pH 6.0 ± 0.1 i 0.1% Proclean 150 kao konzervans. Koristi se za razblaživanje uzoraka.

Napomena: *Diluent menja boju od maslinasto zelene do tamno plavkasto zelene u prisustvu uzorka.*

E. POTREBAN MATERIJAL KOJI SE NE DOBIJA

1. Kalibrisane mikropipete (200 μL i 10 μL) i nastavci za jednokratnu upotrebu.
2. Voda EIA kvaliteta (dvostruko destilovana ili dejonizovana voda, tretirana aktivnim ugljem da bi se uklonile oksidirajuće hemikalije koje se koriste kao dezinfekciona sredstva).
3. Laboratorijski sat za 60 minuta ili više.
4. Upijajući papir.
5. Kalibrisani ELISA mikrolejt termostatski inkubator podešen na $+37^{\circ}\text{C}$.
6. Kalibrisani ELISA mikrolejt čitač sa filtrima 450nm (čitanje) i ako je moguće sa 620-630nm (diferencijalni).
7. Kalibrisani ELISA mikrolejt vošer.
8. Vorteks ili sličan aparat za mešanje.

F. UPOZORENJA I MERE OPREZA

1. Test je namenjen kvalifikovanom i adekvatno obučenom tehničkom osoblju, pod nadzorom lekara odgovornog za laboratoriju. Ovo uputstvo se mora pažljivo pročitati pre upotrebe.
2. Pažljivo pročitati Listu podataka o bezbednosti (SDS) pre upotrebe proizvoda.
3. Kada se test koristi za skrining jedinica krvi i krvnih komponenti, mora da se koristi u sertifikovanoj i kvalifikovanoj laboratoriji od strane nacionalnih organa u toj oblasti (Ministarstva zdravlja ili sličnog subjekta) da sprovede ovu vrstu analize.
4. Svo osoblje uključeno u izvođenje testa mora da nosi zaštitnu odeću, rukavice bez talka i naočare. Izbegavati upotrebu bilo kakvih oštih predmeta (igla, nož). Svo osoblje treba da bude obučeno za biološke postupke, kao što je preporučeno od strane Centra za kontrolu bolesti, Atlanta, SAD i objavljeno u publikaciji Nacionalnog instituta za zdravlja: "Biosigurnost u mikrobiološkim i biomedicinskim laboratorijama", izd.1984.
5. Svo osoblje uključeno u rukovanje uzorcima treba da se vakciniše na NBV i HAV vakcinama koje su dostupne, bezbedne i delotvorne.
6. Laboratorija treba da se kontroliše kako bi se izbegli zagađivači kao što su prašina ili mikrobiološki agensasi iz vazduha prilikom otvaranja bočica sa reagensima i mikroploče i prilikom obavljanja testa. Zaštititi hromogen (TMB) od svetlosti i izbegavati vibracije radne površine, gde se test izvodi.
7. Po prijemu, čuvati komplet na $+2...8^{\circ}\text{C}$ u frižideru sa kontrolisanom temperaturom ili hladnoj sobi.
8. Ne zamenjivati komponente između test kompleta različitih lotova. Ne bi trebalo ni zamenjivati komponente iz dva kompleta istog lota.
9. Proverite da li su reagensi bistri i ne sadrže vidljive čestice ili agregate. Ako nisu, nadzornik laboratorije treba da pokrene neophodne procedure za zamenu kompleta.
10. Izbegavati unakrsne kontaminacije između serum / plazma uzoraka korišćenjem nastavaka za jednokratnu upotrebu i menjanjem posle svakog uzorka.
11. Izbegavati unakrsne kontaminacije između reagenasa u kompletu korišćenjem nastavaka za jednokratnu upotrebu i menjanjem posle svakog od njih.

12. Ne koristiti komplet nakon isteka roka naznačenog na spoljašnjem pakovanju i nalepnicama bočica.
13. Sve uzorke tretirati kao potencijalno infektivne. Svi uzorci humanog seruma treba da se tretiraju na nivou 2 biosigurnosti, prema preporuci Centra za kontrolu bolesti, Atlanta, SAD, objavljenoj u publikaciji Nacionalnog instituta za zdravlje: "Biosigurnost u mikrobiološkim i biomedicinskim laboratorijama", izd.1984.
14. Preporučuje se upotreba plastičnog posuđa za jednokratnu upotrebu za pripremu rastvora za pranje ili pri prenosu komponenti u druge kontejnere automatskih analizatora kako bi se izbegla kontaminacija.
15. Otpad nastao tokom upotrebe kompleta mora da bude odbačen u skladu sa nacionalnim direktivama i zakonima o laboratorijskom otpadu hemijskih i bioloških supstanci. Posebno se tečan otpad od pranja, ostatak kontrole i uzoraka moraju tretirati kao potencijalno infektivni materijal i inaktivirati pre odlaganja. Predložene procedure inaktivacije su tretman sa 10% hipohloritom (varikina) tokom 16-18 sati ili deaktivacije toplotom u autoklavu 20 minuta na 121°C.
16. Slučajna prosipanja moraju biti apsorbovana papirnim maramicama natopljenim hipohloritom, a zatim sa vodom. Papir zatim treba odbaciti u odgovarajući kontejner za laboratorijski / bolnički otpad.
17. Stop rastvor sadrži 0.3 M sumpornu kiselinu. Izbegavajte kontakt sa kožom i očima. U slučaju kontakta, odmah isprati sa velikom količinom vode.
18. Odložite rastvoren reagenasa koji sadrže natrijum azid kao konzervans u skladu sa svim lokalnim, državnim i nacionalnim propisima. Nakon prosipanje reagenasa koji sadrže azide, pustiti veću količinu vode kako bi se isprao slivnik. Prosipanje raditi sa oprezom jer natrijumazid može da formira eksplozivna jedinjenja dužim kontaktom sa olovim ili bakarnim cevima.
19. Ne pušiti, jesti, piti ili primenjivati kozmetiku u prostoru u kojima se obrađuju uzorci ili koristi komplet reagenasa.
20. Ostalim otpadnim materijalom nastalim tokom korišćenja kompleta (npr: nastavci upotrebljeni za uzorke i kontrole, upotrebljen mikrolejt) treba rukovati kao potencijalno infektivnim i odložiti ih u skladu sa nacionalnim zakonima i direktivama o laboratorijskom otpadu.
21. Ne pipetirati ustima.

G. UZORCI: PRIPREMA I PREPORUKE

1. Krv se aseptično povlači venepunkcijom i priprema plazma ili serum standardnim tehnikama za pripremu uzoraka za kliničke laboratorijske analize. Nije od uticaja da li je plazma sa citratom, EDTA i heparinom.
2. Izbegavati dodavanje konzervanasa, posebno natrijum azida, jer će ove hemikalije uticati na enzimsku aktivnost konjugata, generišući lažne negativne rezultate.
3. Uzorci moraju da budu jasno identifikovani kodovima ili imenima, kako bi se izbeglo pogrešno tumačenje rezultata. Kada se komplet koristi za

skrining krvnih jedinica, preporučuje se označavanje bar kodom i elektronsko očitavanje.

4. Haemolizirani (crveni) i vidno hiperlipemični ("mlečni") uzorci moraju da budu odbačeni jer bi mogli da generišu lažne rezultate. Uzorci koji sadrže ostatke fibrina, teške čestice ili filamente i tela mikroba treba odbaciti, jer mogu da dovedu do pogrešnih rezultata.
5. Serum i plazma mogu se čuvati na temperaturi od +2...8°C u periodu do pet dana nakon prikupljanja. Za duže perioda skladištenja, uzorke treba zamrznuti i držati na -20°C tokom nekoliko meseci. Zamrznute uzorke ne bi trebalo ponovo zamrzavati/ odmrzavati jer to može generisati čestice koje mogu uticati na rezultat testa.
6. Ako su čestice prisutne, uzorak prečistiti centrifugiranjem 20 min na 2.000 obrtaja ili filteranjem kroz 0.2-0.8µm filter.

H. PRIPREMA KOMPONENATA I UPOZORENJA

Studija sprovedena na otvorenom kompletu pokazala je da nema nikakvih relevantnih gubitaka performansi nakon 1. ponovnog korišćenja i do 6 meseci nakon prvog otvaranja.

1. Mikroploče:

Pre otvaranja pakovanja ostaviti mikroploču da dostigne sobnu temperaturu (oko 1 h). Proverite da desikant nije postao tamno zelen, što ukazuje na defekt u proizvodnji. U ovom slučaju pozovite Adaltis-ov korisnički servis.

Neiskorišćeni stripovi moraju da budu vraćeni u aluminijumsku vrećicu, zajedno sa isporučenim desikantom, istu dobro zatvoriti i čuvati na +2...8°C.

Nakon prvog otvaranja, neupotrebljeni stripovi su stabilni dok boja indikatora vlažnosti unutar vrećice ne pređe od žute u zelenu.

2. Negativna kontrola:

Spremna za upotrebu. Dobro promešati na vorteksu pre upotrebe.

3. Pozitivna kontrola:

Spremna za upotrebu. Dobro promešati na vorteksu pre upotrebe. Sa kontrolom postupati kao sa potencijalno infektivnim materijalom.

4. Kalibrator:

Pažljivo rastvoriti liofilizovani sadržaj bočice sa količinom vode EIA kvaliteta datoj na nalepnici. Promešati na vorteksu pre upotrebe. Postupati kao sa potencijalno infektivnim materijalom.

Napomena: Rastvoreni kalibrator nije stabilan. Sačuvati zamrznute alikvote na -20°C.

5. 20x koncentrovan pufer za pranje (bočica od 50 mL):

Ceo sadržaj 20x koncentrovanog rastvora mora da se razblaži vodom EIA kvaliteta do 1000 mL (zapremina je data na nalepnici) i lagano promeša nakon pripreme i pre upotrebe. Kako neki kristali soli mogu biti prisutni u bočicu, voditi računa da se kompletan sadržaj rastvori prilikom pripreme rastvora. Tokom pripreme izbegavati stvaranje pene jer prisustvo mehurića može uticati na efikasnosti pranja.

Napomena: Razblažen, rastvor za pranje je stabilan 1 nedelju na +2...8°C.

6. Konjugat:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

Izbegavati kontaminaciju oksidacionim hemikalijama, prašinom i mikrobima. Ako rastvor treba da bude prenet, koristite samo plastične, i ako je moguće, sterilne kontejnere za jednokratnu upotrebu.

7. Supstrat TMB:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu. Izbegavati kontaminaciju oksidacionim hemikalijama, prašinom ili mikrobima. Ne izlažite ga jakom svetlu, oksidantima i metalnim površinama. Ako ova komponenta mora da se prenese koristi samo plastične, ako je moguće, sterilne kontejnere za jednokratnu upotrebu.

8. Test diluent:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

9. Stop rastvor:

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

10. Diluent za uzorke

Spreman za upotrebu. Dobro promešati pre upotrebe na vorteksu.

I. INSTRUMENTI I ALATI KOJI SE KORISTE U KOMBINACIJI SA TESTOM

1. Mikropipete moraju da budu kalibrisane kako bi se pipetirale korrektno zapremine po zahtevu testa i moraju se redovno dekontaminirati oni delovi koji bi mogli slučajno doći u kontakt sa uzorkom (alkoholom za domaćinstvo, 10% rastvorom izbeljivača, dezinfekcionim sredstvima za bolnice). One treba da se redovno održavaju kako bi imale preciznost od 1% i tačnost od $\pm 2\%$. Dekontaminacija prolivenih tečnosti ili ostataka komponenti iz kompleta treba da se vrši redovno.
2. ELISA inkubator treba da bude podešen na +37°C (tolerancija $\pm 0.5^\circ\text{C}$) i redovno proveravan da obezbedi ispravno održavanje temperature. Za inkubaciju su pogodna oba inkubatora, suvi inkubator i vodeno kupatilo, pod uslovom da su validni za inkubaciju ELISA testova.
3. ELISA vošer je izuzetno važan za sve performanse testa. Vošer mora biti pažljivo proveren i pravilno podešen. Obično je dovoljno 4-5 ciklusa pranja (aspiriranje + nalivanje rastvora za pranje 350 μL /čaišici = 1 ciklus) da se obezbede očekivane performanse testa. Preporučuje se vreme natapanja od 20-30 sekundi između ciklusa. Da bi ispravno podesili njihov broj, preporučuje se testiranje kontrolama i dobro karakterisanim negativnim i pozitivnim referentnim uzorcima, i proveru slaganja sa vrednostima prijavljenim ispod u odeljku O "Interna kontrola kvaliteta". Prema instrukcijama proizvođača redovno baždari zapreminu nalivanja i održavati vošer (dekontaminacija i čišćenje igala).
4. Vremena inkubacije imaju toleranciju od +5%.

- ✓ Metoda sa kraćom inkubacijom (ili za 1. / 2. inkubaciju tolerancija je između 43 min i 47 min; za 3. inkubaciju tolerancija je između 14 i 16 min).
- ✓ Metoda sa standardnom inkubacijom (ili za 1. inkubaciju tolerancija je između 57 min i 63 min; za 2. i 3. inkubaciju tolerancija je između 29 i 31 min).

5. filtrom za čitanje 450nm i idealno sa drugim diferencijalnim filtrom (620 - 630nm). Njegove standardne performanse treba da budu (a) širina zraka svetlosti ≤ 10 nm, (b) opseg apsorbance od 0 do ≥ 2.0 (c) linearnost ≥ 2.0 ; ponovljivost $\geq 1\%$. Nuliranje se vrši prema čaišici A1 kao što je dato u odeljku "Test postupak". Optički sistem ridera mora redovno da se kalibriše u cilju pravilnog merenja optičke gustine. Rider treba redovno održavati prema uputstvima proizvođača.
6. Kada se koristi automatizovani ELISA sistem, svi kritični koraci (pipetiranje, inkubacija, pranje, čitanje, rukovanje podacima) moraju biti pažljivo postavljeni, kalibrisani, kontrolisani i redovno servisirani u cilju postizanja vrednosti datih u odeljku o "Unutrašnja kontrola kvaliteta". Test protokol mora da bude instaliran u operativnom sistemu jedinice i proveren kao i vošer i rider. Pored toga, deo stanice za distribuiranje rastvora (pipetiranje i pranje) mora biti validiran i pravilno podešen. Posebna pažnja mora se posvetiti izbegavanju prenošenja (carry over) iglama koje se koriste za pipetiranje uzoraka i za pranje. Ovo se mora pratiti i kontrolisati kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije susednih čaišica zbog snažno reaktivnih uzoraka, što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Upotreba ELISA automatskih sistema preporučuje se za skrining krvi i kada broj uzoraka koji se testira prelazi 20-30 u istom ciklusu.

L. KONTROLA I OPERACIJE PRE TESTIRANJA

1. Proverite rok važnosti kompleta odštampanog na spoljnoj nalepnici (primarni kontejner). Ne koristiti ako je istekao.
2. Proverite da tečne komponente nisu kontaminirane vidljivim česticama ili agregatima. Proverite da li je supstrat TMB rastvora bezbojan ili bledo plav aspiriranjem male količine sterilnom plastičnom pipetom. Proverite da tokom transporta nije došlo do loma ili curenja tečnosti u kutiji (primarni kontejner). Proverite da aluminijumska vrećica sa mikropločom nije probušena ili oštećena.
3. Rastvoriti sav sadržaj 20x koncentrovanog rastvora za pranje kao što je opisano.
4. Rastvoriti kalibrator kao što je opisano i lagano promešati.
5. Ostaviti sve ostale komponente da dostignu sobu temperaturu (oko 1 h), a zatim lagano promešati na vorteksu sve tečne reagense.
6. Postaviti ELISA inkubator na +37°C i pripremiti ELISA vošer punjenjem sa razblaženim rastvorom za pranje, u skladu sa uputstvima proizvođača. Podesiti potreban broj ciklusa pranja kao što se nalaze u odeljku I.3.
7. Proverite da li je ELISA čitač uključen ili obezbediti da bude uključen najmanje 20 minuta pre čitanja.

8. Ako koristite automatizovani ELISA sistem, uključiti ga, proverite podešavanja i budite sigurni da koristite pravi test protokol.
9. Proverite da li su mickopipete postavljene na potrebne zapremine.
10. Proverite da li je sva druga oprema na raspolaganju i spremna za upotrebu.
11. U slučaju problema, prekinuti sa radom i posavetovati se sa nadzornikom.

M. POSTUPAK TESTA

Test mora da se izvrši u skladu sa ovim uputstvom, vodeći računa da se održi isto vreme inkubacije za sve uzorke pri testiranju.

Test postupak može da se uradi sa dva vremena inkubacije. Izaberite onaj koji odgovara vašem propisu:

1. Standardna inkubacija (1. inkubacije 60 minuta, 2. i 3. inkubaciju 30 minuta)
2. Kratka inkubacija (1. i 2. inkubacija 45 minuta, 3. inkubacija 15 minuta)

1. Standardna inkubacija – manuelni postupak

1. Postavite potreban broj stripova na mikrolejt nosač. Ostavite čašicu A1 praznu za nuliranje aparata (slepa proba).
2. Pipetirati 200 µL negativne kontrole u triplikatu, 200 µL kalibratora u duplikatu i jednom 200 µL pozitivne kontrole u odgovarajuće čašice. Ne rastvarati kontrole i kalibrator jer su spremni za upotrebu!
3. Dodajte 200 µL diluenta za uzorke u sve čašice za uzorke, a zatim pipetirati 10 µL uzorka u svaku pravilno identifikovanu čašicu. Pomerati lagano ploču radi mešanja diluenta i uzorka, izbegavajući prelivanje i međusobno zagađenje susednih čašica.

Važna napomena: Proverite da li se boja diluenta za uzorke, nakon dodavanja uzoraka, menja od svetlo zelene do tamno plavo-zelene, što je potvrda da je uzorak zaista dodat.

4. Naliti 50 µL test diluenta u sve čašice sa kontrolama/ kalibratorom i uzorcima. Proverite da li je boja uzoraka tamno plava.
5. Inkubirati mikroploču **60 min na +37°C**.
Važna napomena: Stripovi moraju da budu pokriveni samolepljivom folijom iz pakovanja, samo kada se test obavlja ručno. Ne pokrivati stripove kada se koriste ELISA automatski aparati.
6. Oprati mikroploče na automatskom vošeru nalivanjem i aspiriranjem 350 µL/čašici razblaženog rastvora za pranje kao što je rečeno u odeljku I.3.
7. Pipetirati 100 µL enzim konjugata u sve čašice osim u A1, slepu probu, i pokriti ih folijom. Proverite da li je ovaj crveno obojeni rastvor u svim čašicama, osim A1.

Važna napomena: Pazite da ne dodirujete unutrašnju plastičnu površinu vrhom nastavka pri pipetiranju enzim konjugata. Moguća kontaminacija.

8. Inkubirati mikroploču **30 min na +37°C**.
9. Oprati mikroploču kao što je rečeno u odeljku I.3.
10. Pipete 100 µL supstratnog TMB rastvora u sve čašice, uključujući A1. Zatim inkubirati mikroploču na

sobnoj temperaturi (+18...24°C) u trajanju od **30 minuta**.

Važna napomena: Ne izlagati direktnom jakom svetlu.

11. Pipetirajte 100 µL stop rastvora u sve čašice da se zaustavi enzimski reakcija koristeći isti redosled pipetiranja kao u koraku 10. Dodatak stop rastvora će promeniti boju pozitivne kontrole i pozitivnih uzoraka od plave do žute.
12. Meriti intenzitet boje rastvora u svim čašicama, kao što je opisano u odeljku I.5, na 450nm (čitanje) i eventualno na 620-630nm (diferencijalni), nulirati instrument sa A1.

Važne napomene:

1. Ako drugi filter nije dostupan, pobrinite se da nema otisaka prstiju na dnu mikročašica pre čitanja na 450 nm. Otisci prstiju mogu da generišu pri čitanju lažno pozitivne rezultate.
2. Idealno je izvesti merenje odmah nakon dodavanja stop rastvora, ali svakako ne posle više od 20 minuta. Zbog oksidacije hromogena može da dođe do veće obojenosti.
3. Dokazano je da mešanje na 350 ± 150 O/min. tokom inkubacije povećava osetljivost testa za oko 20%.

2. Kraća inkubacija – manuelni postupak

1. Postavite potreban broj stripova na mikrolejt nosač. Ostavite čašicu A1 praznu za nuliranje aparata (slepa proba).
2. Pipetirati 200 µL negativne kontrole u triplikatu, 200 µL kalibratora u duplikatu i jednom 200 µL pozitivne kontrole u odgovarajuće čašice. Ne rastvarati kontrole i kalibrator jer su spremni za upotrebu!
3. Dodajte 200 µL diluenta za uzorke u sve čašice za uzorke, a zatim pipetirati 10 µL uzorka u svaku pravilno identifikovanu čašicu. Pomerati lagano ploču radi mešanja diluenta i uzorka, izbegavajući prelivanje i međusobno zagađenje susednih čašica.

Važna napomena: Proverite da li se boja diluenta za uzorke, nakon dodavanja uzoraka, menja od svetlo zelene do tamno plavo-zelene, što je potvrda da je uzorak zaista dodat.

4. Naliti 50 µL testa diluenta u sve čašice sa kontrolama/ kalibratorom i uzorcima. Proverite da li je boja uzoraka tamno plava.
5. Inkubirati mikroploču **45 min na +37°C**.
Važna napomena: Stripovi moraju da budu pokriveni samolepljivom folijom iz pakovanja, samo kada se test obavlja ručno. Ne pokrivati stripove kada se koriste ELISA automatski aparati.
6. Oprati mikroploče na automatskom vošeru nalivanjem i aspiriranjem 350 µL/čašici razblaženog rastvora za pranje kao što je rečeno u odeljku I.3.
7. Pipetirati 100 µL enzim konjugata u sve čašice osim u A1, slepu probu, i pokriti ih folijom. Proverite da li je ovaj crveno obojeni rastvor u svim čašicama, osim A1.

Važna napomena: Pazite da ne dodirujete unutrašnju plastičnu površinu vrhom nastavka pri pipetiranju enzim konjugata. Moguća kontaminacija.

8. Inkubirati mikroploču **45 min na +37°C**.
9. Oprati mikroploču kao što je rečeno u odeljku I.3.
10. Pipete 100 µL supstratnog TMB rastvora u sve čašice, uključujući A1. Zatim inkubirati mikroploču na sobnoj temperaturi (+18...24°C) u trajanju od **15 minuta**.

Važna napomena: Ne izlagati direktnom jakom svetlu.

11. Pipete 100 µL stop rastvora u sve čašice da se zaustavi enzimska reakcija koristeći isti redosled pipetiranja kao u koraku 10. Dodatak stop rastvora će promeniti boju pozitivne kontrole i pozitivnih uzoraka od plave do žute.
12. Meriti intenzitet boje rastvora u svim čašicama, kao što je opisano u odeljku I.5, na 450 nm (čitanje) i eventualno na 620-630 nm (diferencijalni), nulirati instrument sa A1.

Važne napomene:

1. Ako drugi filter nije dostupan, pobrinite se da nema otisaka prstiju na dnu mikročašica pre čitanja na 450 nm. Otisci prstiju mogu da generišu pri čitanju lažno pozitivne rezultate.
2. Idealno je izvesti merenje odmah nakon dodavanja stop rastvora, ali svakako ne posle više od 20 minuta. Zbog oksidacije hromogena može da dođe do veće obojenosti.
3. Dokazano je da mešanje na 350 ± 150 O/min. tokom inkubacije povećava osetljivost testa za oko 20%.

N. ŠEMA IZVOĐENJA TESTA

Metoda	Standardna inkubacija	Kratka inkubacija
Kontrole/kalibrator	200 µL	200 µL
Diluent za uzorke & uzorci	200 µL diluenta + 10 µL uzorka	200 µL diluenta + 10 µL uzorka
Test diluent	50 µL	50 µL
Prva inkubacija	60 min (± 3)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Broj ciklusa pranja	4-5	4-5
Enzim konjugat	100 µL	100 µL
Druga inkubacija	30 min (± 1)	45 min (± 2)
Temperatura	+37°C	+37°C
Broj ciklusa pranja	4-5	4-5
Supstrat TMB	100 µL	100 µL
Treća inkubacija	30 min (± 1)	15 min (± 1)
Temperatura	Sobna (+18...24°C)	Sobna (+18...24°C)
Stop rastvor	100 µL	100 µL
Čitanje OD	450/620 nm	450/620 nm

Primer šeme pipetiranja je dat u tabeli:

		Mikroplejt											
		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											

Legenda: BLK = slepa proba NC = negativna kontrola
CAL = kalibrator PC = pozitivna kontrola S = uzorak

O. UNUTRAŠNJA KONTROLA KVALITETA

U bilo koje vreme tokom korišćenja testa izvoditi provere sa kontrolama / kalibratorom kako bi se proverilo da li se slažu očekivane OD450nm ili Co / S vrednosti date u tabeli.

Parametar	Zahtevi
Slepa proba	< 0.100 OD _{450/620nm}
Negativna kontrola (NC)	> 0.050 srednja OD _{450/620nm} vrednost nakon blankiranja
Kalibrator 10 mIU/mL (WHO)	S / Co > 1.1
Pozitivna kontrola	> 1.000 OD _{450/620nm}

Ako rezultati testa odgovaraju gore navedenim zahtevima, pređite na sledeći odeljak. Ako to nije, ne nastavljati dalje i uraditi sledeće provere:

Problems	Proveriti
Slepa proba > 0.100 OD _{450 nm}	1. da supstratni rastvor nije kontaminiran tokom testiranja.
Negativna kontrola (NC) > 0.050 OD _{450/620 nm} nakon blankiranja	1. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je dato; 2. da je upotrebljen odgovarajući rastvor za pranje i da je vošer prethodno napunjen tim rastvorom; 3. da nije napravljena greška u postupku analize (nalivena pozitivna kontrola umesto negativne kontrole); 4. da nema kontaminacije negativne kontrole ili čašice gde je nalivena pozitivnim uzorkom, prelivanjem ili enzim konjugatom; 5. da mikropipete nisu kontaminirane pozitivnim uzorkom ili enzimom konjugatom 6. da igle za pranje nisu blokirane ili delimično zapušene.
Kalibrator S/Co < 1.1	1. da je postupak ispravno obavljen; 2. da nije greška nastala u njegovoj distribuciji (npr. nalivena negativna kontrola umesto kalibratora); 3. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je potvrđeno u predkvalifikacionoj studiji; 4. da nije došlo do spoljne kontaminacije kalibratora.

Pozitivna kontrola < 1.000 OD ₄₅₀	<ol style="list-style-type: none"> 1. da je postupak ispravno obavljen; 2. da nije greška nastala u raspodeli kontrole (npr.: naneta negativna kontrola, umesto pozitivne). U ovom slučaju, negativna kontrola će imati OD_{450nm} vrednost > 0.150, takođe; 3. da je proces pranja i podešenost vošera kao što je potvrđeno u predkvalifikacionoj studiji; 4. da nije došlo do spoljne kontaminacije pozitivne kontrole.
--	--

Ukoliko je došlo do bilo kog od gore navedenih problema, prijavite problem supervizoru radi daljeg delovanja.

P. REZULTATI

Rezultati testa se izračunavaju pomoću granične (cut-off) vrednosti utvrđene po sledećoj formuli:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{MNC} + 0.350$$

vrednosti nađene za test koriste se za tumačenje rezultata kao što je opisano u sledećem paragrafu.

Q. TUMAČENJE REZULTATA

Rezultati testa se tumače kao odnos OD_{450nm} uzorka i granične vrednosti (cut off) (ili S/Co) prema sledećoj tabeli:

S/Co	Interpretacija
< 0.9	Negativan
0.9 - 1.1	Ekvivokalan (sumnjiv, neodređen)
> 1.1	Pozitivan

Negativan rezultat ukazuje na to da pacijent nije zaražen sa HCV ili da jedinica krvi može biti upotrebljena za transfuziju.

Svaki pacijent sa ekvivokalnim rezultatom treba da se ponovo testira na drugom uzorku 1-2 nedelje nakon inicijalnog uzorka. Jedinica krvi ne može biti upotrebljena za transfuziju.

Pozitivan rezultat je indikacija HCV infekcije i u skladu sa tim treba postupati sa pacijentom. Jedinicu krvi treba baciti.

Važne napomene:

1. Tumačenje rezultata treba da se uradi pod nadzorom odgovorne osobe laboratorije da se smanji rizik od grešaka procene i pogrešnog tumačenja.
2. Svaki pozitivan rezultat treba da bude potvrđen alternativnim metodom koji može da otkrije IgG i IgM antitela (test potvrde) pre uspostavljanja dijagnoze virusnog hepatitisa.
3. Kao što je dokazano u performansama testa, test može da otkrije serokonverziju antitela na anti HCV jezgra ranije od nekih drugih komercijalnih testova. Zbog toga pozitivni rezultati, koji nisu potvrđeni sa ovim komercijalnim testovima ne moraju da budu isključeni kao lažno pozitivan rezultat! Uzorak mora u svakom slučaju da bude testiran potvrđnim testom.
4. Sve dok test može da otkrije i IgM antitela neki potpuno različiti rezultati sa drugim komercijalnim proizvodima za detekciju anti HCV antitela – u kojima nedostaje anti hlgM konjugat u formulisanju enzima

tragača i time i IgM reaktivnosti - mogu da budu prisutni. Prava pozitivnost uzorka za antitela na HCV treba da bude potvrđena ispitivanjem i IgM reaktivnosti, važne za dijagnozu HCV infekcije.

5. Kada su rezultati testa prenose iz laboratorije do informatičkog centra, pažnja mora da se obrati da se izbegne pogrešan prenos podataka.
6. Dijagnozu infekcije virusnog hepatitisa mora da uradi i saopšti je pacijentu samo kvalifikovani lekar.

Dat je primer obračuna.

Sledeći podaci ne smeju da se koriste umesto rezultata dobijenih od strane korisnika.

Negativna kontrola: 0.019 - 0.020 - 0.021 OD_{450nm}

Srednja vrednost: 0.020 OD_{450nm}

Niže od 0.050 – Prihvaćeno

Pozitivna kontrola: 2.189 OD_{450nm}

Više od 1.000 – Prihvaćeno

Granična (Cut-off) vrednost = 0.020 + 0.350 = 0.370

Kalibrator: 0.550-0.530 OD_{450nm}

Srednja vrednost: 0.540 OD_{450nm} S/Co = 1.4

S/Co > 1.1 - Prihvaćeno

Uzorak 1: 0.070 OD_{450nm}

Uzorak 2: 1.690 OD_{450nm}

Uzorak 1 S/Co < 0.9 negativan

Uzorak 2 S/Co > 1.1 pozitivan

R. PERFORMANSE

Evaluacija performansi je sprovedena u skladu sa onim datim u Zajedničkim tehničkim specifikacijama (Common Technical Specifications ili CTS) (čl. 5, Poglavlje 3 IVD Direktive 98/79/EC) i sa obe inkubacije (standardna procedura i kratka).

1. GRANICA DETEKCIJE

Granica detekcije testa je izračunata korišćenjem postupka kratke inkubacije upotrebom britanskog radnog standarda za anti-HCV, kod NIBSC 06/188-006. U tabeli su date srednje vrednosti OD_{450nm} ovog standarda razblaženog negativnom plazmom pre testiranja.

Razblaženje	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktor	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
Negativna plazma	0,25	0,20	0,20

Uz to testiran je "u celosti" uzorak kodiran Accurun 1 - serije 3000 – koji je isporučio Boston BIOMEDICA Inc, SAD, rezultati su dati u nastavku:

Accurun 1 serija	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktor	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. DIJAGNOSTIČKA SPECIFIČNOST I SENZITIVNOST

Procena rada testa sprovedena je ispitivanjem više od ukupno 5.000 uzoraka.

2.1 Dijagnostička specifičnost

Definiše se kao verovatnoća da test bude negativan u odsustvu specifičnog analita. Testirano je ukupno više od 5000 neizabranom donora, uključujući i donore po 1. put. Dijagnostička specifičnost je ocenjena u odnosu na test odobren od strane US FDA. Testiranjem 5043 davalaca krvi utvrđena je specifičnost 99.5%. 210 hospitalizovanih pacijenata testirano je na HCV Ab; nađena dijagnostički specifičnost je 99.5%. Uz to, dijagnostička specifičnost je procenjena testiranjem 162 potencijalno ometajuća uzorka (druge zarazne bolesti, pozitivni na E.coli antitela, pacijenti sa nevirusnim bolestima jetre, pacijenti na dijalizi, trudnice, hemolizirani, lipemični, itd). Vrednost specifičnosti je 100%. Nije primećena lažna reaktivnost zbog načina pripreme uzorka. Za određivanje specifičnosti korišćene su plazme, proizvedene različitim standardnim tehnikama (citrat, EDTA i heparin) i serumi. Zamrznuti uzorci su takođe testirani kako bi se proverilo da li to ometa obavljanje testa. Nisu primećene nikakve smetnje.

2.2 Dijagnostička senzitivnost

Dijagnostička senzitivnost se definiše kao verovatnoća da test bude pozitivan u prisustvu specifičnog analita. Dijagnostička senzitivnost je eksterno utvrđena na ukupno 348 uzoraka; nađeno je da je dijagnostički senzitivnost 100%. Interno je testirano više od 50 drugih pozitivnih uzoraka, i opet je utvrđeno da je vrednost dijagnostičke senzitivnosti 100%. Takođe su testirani pozitivni uzorci infekcija različitih genotipova HCV. Osim toga ispitivana je većina dostupnih serokonverzionih panela iz BIOMEDICA Inc, Bostona, SAD, (PHV) i Zeptomatrik, SAD, (HCV).

Rezultati za neke od njih dati su u tabeli:

Panel	Br.uzoraka	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

Napomena:

1. Detektovani pozitivni uzorci
2. HCV v.3.0

Konačno, proizvod je testiran na panelu EFS Ac HCV, lot 06.140817, dobijen od Etablissement Francais Du Sang (EFS), u Francuska, sa sledećim rezultatima:

EFS Panel Ac HCV

Uzorak	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Prosečna vrednost
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negativan
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitivan
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitivan
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitivan
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitivan
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitivan

4. PRECIZNOST

Obračunata je na pet uzoraka, jedan negativan i četiri pozitivna testirana u 4 ponavljanja u šest odvojen ciklusa. Preciznost, dobijena za oba protokola, je ista. Rezultati su dati na sledeći način:

*Intra-lot rezultati: EIAGEN HCV Ab (v.4) Kit -
1.Lot (kratka inkubacija)*

Uzorak	S/Co srednje	Precision - %CV		
		U istom ciklusu	Između ciklusa	Ukupno
Negativan	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitivni	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

*Intra-lot rezultati: EIAGEN HCV Ab (v.4) Kit -
1.Lot (duža inkubacija)*

Uzorak	S/Co srednje	Preciznost - %CV		
		U istom ciklusu	Između ciklusa	Ukupno
Negativan	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitivni	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

*Inter-lot rezultati: EIAGEN HCV Ab (v.4) Kit -
1., 2. i 3. Lot (kratka inkubacija)*

Uzorak	Preciznost - %CV		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Negativan	8,65	8,29	6,13
Kalibrator	4,98	4,44	5,38
Pozitivan	4,11	3,11	1,37

Varijabilnost prikazana u tabelama nije dovela do pogrešne klasifikacije uzorka.

S. PREDLOZI ZA REŠAVANJE PROBLEMA

Pridržavanje procedure testa i specifikacije, kao i pravilna upotreba reagenasa i pravilno pipetiranje, mogu pomoći da se izbegnu sledeće vrste grešaka:

Problem	Proveriti
OD veoma različita ($\pm 50\%$) od OD iz kontrole kvaliteta	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - Netačno doziranje količine reagenasa (predlog: proverite usaglašenost između pipetirane zapremine od strane pipete i one koju zahteva test; pre-kalibrisati pipete) - Netačna temperatura ili netačno vreme inkubacije (predlog: posvetiti veću pažnju održavanju inkubatora; zapisati početak inkubacije) - Greška u pranju ili u fotometarskom čitanju (predlog: proveriti rad ili podešenost odgovarajućih instrumenata) - Kontaminacija supstrata ili konjugata (predlog: koristi samo čiste plastične kontejnere za jednokratnu upotrebu)
Niska reproduktivnost rezultata	<ul style="list-style-type: none"> - Nekonstantna zapremina pri pipetiranju uzoraka ili reagenasa (predlog: proveriti preciznost pipeta i usaglašenost između pipetirane zapremine i one koju zahteva test, re-kalibrisati pipete) - Greška u pranju ili u fotometarskom čitanju (predlog: proveriti rada ili podešenost odgovarajućih instrumenata) - Kontaminacija supstrata ili konjugata (predlog: koristi samo čiste plastične kontejnere za jednokratnu upotrebu) - zagađenje ili degradacija reagensa (sugestija: koristiti odgovarajuće nastavke, za jednokratnu upotrebu i čiste plastične kontejnere za reagense i visoko kvalitetnu destilovanu vodu ili vodu ekvivalentnog kvaliteta).
Nema kolorimetrijske reakcija nakon dodavanja supstrata	<ul style="list-style-type: none"> - neki reagens nije pipetiran - jaka kontaminacija konjugata ili supstrata - greške u postupku izvođenja testa (npr. slučajno pipetiranje reagenasa u pogrešnom redosledu ili iz pogrešne bočice, itd)
Previše slaba reakcija (suviše niske OD)	<ul style="list-style-type: none"> - Vreme inkubacije prekratko, temperatura inkubacije suviše niska - netačno razblaživanje konjugata
Previše jaka reakcija (suviše visoke OD)	<ul style="list-style-type: none"> - netačno razblaživanje konjugata - suviše dugo vreme inkubacije, temperatura inkubacije suviše visoka - kvalitet vode za pripremu pufera za pranje nedovoljan (nizak stepen dejonizacije) - nedovoljno pranje (konjugat nije potpuno uklonjen)
Neobjašnjiva iskakanja	<ul style="list-style-type: none"> - kontaminacija pipeta, nastavaka ili kontejnere - nestabilno i nedovoljno pranje (konjugat nije pravilno uklonjen)
Previsok CV% u ciklusu	<ul style="list-style-type: none"> - Reagensi i / ili stripovi nisu prethodno zagrejani do sobne temperature pre upotrebe - plejt vošer ne pere pravilno (predlog: očistiti glavu za pranje)

Previsok CV% između ciklusa	<ul style="list-style-type: none"> - Uslovi inkubacije nisu konstantni (vreme, temperatura) - kontrole i uzorci nisu pipetirane u isto vreme (sa istim intervalima) (proverite redosled pipetiranja) - Lične varijacije u radu
-----------------------------	---

T. AUTOMATIZACIJA

Procedure date u ovom uputstvu za upotrebu su isključivo za ručno testiranje. Kada se koriste automatizovani instrumenti, poštovati procedure koje je dao proizvođač uređaja u uputstvu za rukovanje. Laboratorije moraju da prate svoje odobrene procedure validacije da dokažu kompatibilnost ovog proizvoda sa automatizovanim sistemom.

U. OGRANIČENJA

Procenjuje se da je udeo lažno pozitivnih rezultata, nepotvrđenih RIBA ili sličnim tehnikama, manji od 0.1% kod normalne populacije.

Primećeno je da zamrznuti uzorci koji sadrže fibrinske čestice ili agregate posle odmrzavanja generišu izvesne lažne rezultate.

BIBLIOGRAFIJA

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. Fingerhood 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 Tlymphotropic 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.



EIAgen

HCV Ab (v.4) Kit

REF 071067

Σ 96

REF 071064

Σ 192

REF 071068

Σ 480



IVD

CE 0459

Paketin içindeki prospektüs, ürünü kullanmadan önce dikkatlice okunmalıdır.

Paketteki prospektüs dikkatle takip edilmelidir.

Pakette yer alan talimatlarından herhangi bir sapma olması halinde, tahlil sonuçlarının güvenilirliği garanti edilemez.



Üretici:

Adaltis S.r.l

Via Durini, 27

20122 Milano (Italy)

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

www.adaltis.net

tr

ETİKETLERDE KULLANILAN SEMBOLLER

Türkçe TR							
	In Vitro Diagnostik Medikal Ürün	Katalog numarası	Lot Numarası	Dikkat, kullanım talimatlarına bakın	Sıcaklık sınırlaması	Tarafından Kullanılan	Test sayısı
	Üretici	Güneş ışığından uzak tutun	Üretim tarihi	Mikroplak	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Kalibratör
	Konjugat	Numune Dilüenti	Substrat TMB	Stop Solüsyonu (H ₂ SO ₄ 0,3 M)	Yıkama Bufer konsantre (20x)	Test Dilüenti	x mL ile sulandırma
	Biyolojik riskler	Tehlike	Uyarı				

Dikkat:

Stop Solüsyonu, Cilt Kor.1A'ya gibi Cilt Kor. 1A



- **Uyarı ifadesi:**
Tehlike
- **Tehlikeyi belirleyici bileşenler için etiketlendirme:**
Sülfürik asit
- **Tehlike Açıklamaları**
H314 Ciddi derecede deri yanıkları ve göz hasarına neden olur.
- **Önlem Açıklamaları:**
P260 Tozu/dumanı/gazı/ buharı/asit buharını/püsküren maddeleri solumayın.
P361+P353 Cilt temasında(veya aç): Kontamine olan tüm giysileri derhal çıkarın. Cildi su / duş ile yıkayın.
P305+P351+P338 GÖZ TEMASINDA: Birkaç dakika su ile dikkatlice yıkayın. Varsa ve kolayca çıkarılabiliyorsa, kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin
P310 Hemen bir ZEHİR MERKEZİ'ne/ Doktor /.. 'a başvurun.
P405 Kilitli saklayın.
P501 İçindekileri Ulusal / bölgesel / yerel / uluslararası yönetmeliklere uygun olarak imha edin.

Dikkat:

Negatif Kontrol, Pozitif Kontrol, Kalibratör, Konjugat, Numune Dilüenti, Test Dilüenti ve Yıkama Bufer Konsantresi 20X Cilt Hassasiyeti 1'e göre sınıflandırılmıştır.



- **Uyarı ifadesi:**
Uyarı
- **Tehlikeyi belirleyici bileşenler için etiketlendirme:**
Reaksiyon kümesi: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC no. 247-500-7] ve 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)
- **Tehlike Açıklamaları**
H317 Allerjik deri reaksiyonuna neden olabilir.
- **Önlem Açıklamaları:**
P261 Tozu / dumanı / gazı / sisi / buharı / spreyi solumayınız.
P280 Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruyucu/yüz koruyucusu kullanın.
P321 Özel işlem/tedavi (etikete bakın).
P333 + P313 Ciltte tahriş veya kızarıklık meydana gelirse: Tıbbi yardım/destek alın.
P302+P352 CİLT TEMASINDA: Bol su ile yıkayın.
P501 İçindekileri Ulusal / bölgesel / yerel / uluslararası yönetmeliklere uygun olarak imha edin.

Güvenlik Bilgi Formları için www.adaltis.net adresine bakın.

A. KULLANIM AMACI

İnsan plazmasında (EDTA, Heparin ve Sitrat) ve serumunda, Hepatit C Virüsüne karşı antikörlerin saptanması için Dördüncü Nesil Enzim İmmünoAsayay (ELISA). Kit, HCV enfekte hastaların kan ünitelerinin taranması için kullanılabilir.

Sadece in vitro diagnostik kullanım içindir.

B. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Hepatit C enfeksiyonunu şu şekilde tanımlar:

"Hepatit C, 1989'da nedensel maddenin tanımlanmasına kadar parenteral yoldan bulaşan" non-A, non-B hepatit "olarak anılan, bir karaciğer viral enfeksiyonudur. Hepatit C virüsünün (HCV) keşfi ve karakterizasyonu, transfüzyon sonrası hepatitteki ana rolünün ve devam eden enfeksiyonu tetikleme eğiliminin anlaşılmasına yol açtı.

HCV, siroz ve karaciğer kanseri de dahil olmak üzere akut hepatit ve kronik karaciğer hastalığının önemli nedenidir. Global olarak, tahminen 170 milyon kişi HCV ile kronik olarak enfektedir ve her yıl 3-4 milyon kişi ise yeni enfekte olmaktadır. HCV öncelikle, insan kanıyla doğrudan temas yoluyla yayılır. Dünya genelinde HCV enfeksiyonunun başlıca nedenleri, taramasız kan transfüzyonlarının kullanılması ve yeterince sterilize edilmemiş iğnelerin ve şırıngaların yeniden kullanılmasıdır. Hepatit C'yi önlemek için halihazırda herhangi bir aşı mevcut değildir ve gelişmekte olan ülkelerdeki çoğu kişinin alması gereken kronik hepatit C için tedavi maliyeti ise çok yüksektir. Bu nedenle, global perspektiften bakıldığında, hepatit C hastalığının üzerindeki en büyük etki, hastane kaynaklı maruziyetlerden HCV bulaşma riskini azaltmaya yönelik çabalara odaklanarak (örneğin, kan nakli, güvensiz enjeksiyon uygulamaları) ve yüksek riskli davranışlar giderilerek (örneğin; uyuşturucu/ilaç enjeksiyonu) elde edilecektir.

Hepatit C virüsü (HCV), viral hepatit vak'alarının büyük çoğunluğunu oluşturan virüslerden biridir (A, B, C, D ve E). Flaviviridae ailesinde dar bir konak aralığı olan, zarflı bir RNA virüsüdür. İnsanlar ve şempanzeler, enfeksiyona duyarlı bilinen türlerdir ve her iki türde de hastalık benzer şekilde geliştirmektedir. Virüsün önemli bir özelliği, genomunun göreceli olarak değişebilirliği ve bu da muhtemelen kronik enfeksiyonun uyarma eğiliminin (% 80) yüksek olması ile ilgilidir. HCV, hastalığın şiddetinin ve tedaviye verilen cevabın belirlenmesinde önemli olabilecek birkaç farklı genotipe kümelendirilmiştir.

Klinik semptomların başlamasından önceki HCV enfeksiyonunun kuluçka süresi, 15 ila 150 gün arasında değişir. Akut enfeksiyonlarda en sık görülen belirtiler yorgunluk ve sarılıktır; Bununla birlikte, vakaların çoğunluğunda (% 60 ila % 70 arasında), hatta kronik enfeksiyon gelişenler de semptomatiktir. Yeni enfekte olmuş hastaların yaklaşık % 80'inde kronik enfeksiyon gelişir. Siroz, kronik enfeksiyonu olan kişilerin yaklaşık % 10 ila % 20'sinde ortaya çıkar ve karaciğer kanseri, 20 ila 30 yıl arasında, kronik enfeksiyonu olan kişilerin % 1 ila %

5'inde gelişir. Hepatit B virüsü enfeksiyonu olmayan karaciğer kanseri hastalarının çoğunda HCV

enfeksiyonunun bulguları vardır. HCV enfeksiyonunun karaciğer kanserine yol açtığı mekanizmalar, hala belirsizdir. Hepatit C, diğer karaciğer rahatsızlıklarıyla bir arada bulunması durumunda, altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyetini de artırır. Özellikle, karaciğer hastalığı, alkole bağlı karaciğer hastalığı ve HCV enfeksiyonu olan kişiler arasında daha hızlı ilerlemektedir. HCV öncelikle, insan kanıyla doğrudan temas yoluyla yayılır. HCV enfeksiyonu açısından taranmamış olan kan nakli yoluyla, sterilize edilmemiş iğnelerin, şırıngaların veya diğer tıbbi ekipmanların tekrar kullanılmasıyla veya uyuşturucu kullanıcıları arasında iğne paylaşımı yoluyla bulaşma belgelenmiştir. Daha az sıklıkta olmasına rağmen, cinsel ve perinatal bulaşma da görülebilir. Perkütan işlemler (örn., Kulak ve vücuda delme, sünet etme, dövme) kullanımı, sosyal, kültürel ve davranışsal uygulamalar gibi diğer bulaşma şekilleri, steril olmayan ekipman kullanıldığında ortaya çıkabilir. HCV hapşırma, sarılma, öksürme, yemek ya da su, yeme aletlerini paylaşma ya da sıradan temasla bulaşmaz.

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde, yüksek riskli gruplar, enjeksiyonla uyuşturucu kullananlar, taranmamış kan alıcısı, hemofili hastaları, diyaliz hastaları ve korunmasız cinsel ilişkide bulunan çok sayıda seks partnerine sahip kişilerdir. Gelişmiş ülkelerde, kronik HCV enfeksiyonu olan kişilerin % 90'ının, mevcut ve eski enjeksiyonla ilaç kullananların ve taranmamış kan veya kan ürünleri transfüzyon öyküsü olanların olduğu tahmin edilmektedir. Taranmamış kan ve kan ürünlerinin halen kullanıldığı birçok gelişmekte olan ülkede, en önemli bulaşma yolu, sterilize edilmemiş enjeksiyon ekipmanları ve taramasız kan transfüzyonlarıdır. Ayrıca, geleneksel skarifikasyon ve sünet yapılan insanlar da sterilize edilmemiş araçları kullandıklarında veya yeniden kullandıklarında risk altındadırlar.

WHO, dünya nüfusunun yaklaşık % 3'üne, 170 milyon kişiye HCV bulaştığını ve bunların karaciğer sirozu ve / veya karaciğer kanseri gelişme riski altında olduğunu tahmin etmektedir. Afrika, Doğu Akdeniz, Güneydoğu Asya ve Batı Pasifik'teki (prevalans verileri mevcut olduğunda) bazı ülkelerdeki HCV enfeksiyonunun prevalansı, Kuzey Amerika ve Avrupa'daki bazı ülkelerle karşılaştırıldığında daha yüksektir.

HCV için teşhis testleri, vericinin kan ve plazmasının taranması yoluyla enfeksiyonu önlemek, klinik tanıyı oluşturmak ve hastanın tıbbi tedavisi ile ilgili daha iyi kararlar almak için kullanılır. Günümüzde piyasada mevcut olan teşhis testleri, HCV'ye spesifik antikörlerin saptanması için Enzyme immünsorbent tahlili (EIA) esaslıdır. EIAs, kronik olarak enfekte hastaların % 95'inden fazlasını saptayabilir, ancak akut enfeksiyonların yalnızca % 50 ila % 70'ini tespit edebilir. Bireysel HCV antijenleriyle reaksiyona giren antikörleri tanımlayan rekombinant immünoblot testi (RIBA), pozitif bir EIA sonunun doğrulanması için ek bir test olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Amplifikasyon testleri ile dolaşımdaki HCV için RNA test edilir (örn. Polimeraz zincir reaksiyonu veya PCR, dallı DNA tahlili), ayrıca antiviral tedavinin etkililiğini değerlendirmek adına,

serolojik sonuçların doğrulanması için de kullanılmaktadır. Pozitif sonuç, aktif enfeksiyon varlığına ve enfeksiyonun yayılmasına ve / veya kronik karaciğer hastalığının gelişmesine işaret etmektedir.

Tek başına veya ribavirin ile kombine edilen interferon gibi antiviral ilaçlar, kronik hepatit C'li kişilerin tedavisinde kullanılabilir, ancak tedavi maliyeti çok yüksektir. Tek başına uygulanan interferon tedavisi, hastaların yaklaşık% 10 ila% 20'sinde etkilidir. Ribavirin ile kombine edilen interferon tedavisi ise, hastaların yaklaşık% 30 ila% 50'sinde etkilidir. Ribavirin tek başına kullanıldığında etkili gibi gözükmemektedir.

HCV'ye karşı aşı yoktur. Araştırmalar devam etmekle beraber, HCV genomunun yüksek değişkenliği aşı gelişimini karmaşıklaştırmaktadır. HCV enfeksiyonunu takiben koruyucu bağışıklık tepkisinin bilinmemesi, aşı araştırmalarını da engeller. Bağışıklık sisteminin, virüsü ortadan kaldıracak yapıda olup olmadığı ise bilinmiyor.

Bununla birlikte, bazı çalışmalar HCV enfeksiyonu olan hastalarda, virüsü nötralize edici antikörlerin varlığını göstermiştir. Bir aşının olmayışı nedeniyle enfeksiyonu önlemeye yönelik tüm tedbirler alınmalıdır: (a) kan ve organ vericilerinin taranması ve test edilmesi; (b) Plazma türevi ürünlerinin virüs inaktivasyonu; (c) tıbbi ve diş hekimliğinin uygun şekilde sterilizasyonu da dahil olmak üzere, sağlık bakım yerlerinde enfeksiyon kontrol uygulamalarının uygulanması ve sürdürülmesi; (d) enjeksiyonların aşırı kullanımını azaltmak ve güvenli enjeksiyon uygulamalarını kullanmak için genel halk ve sağlık çalışanları arasında davranış değişikliğinin teşvik edilmesi; ve (e) Yüksek riskli uyuşturucu ve cinsel uygulamaları olan kişiler için risk azaltma danışmanlığı. "

Genom, yapısal bileşenleri, bir nucleocapsid proteini ve iki zarf glikoproteini ve virüs replikasyonu ve protein işleme ile ilgili işlevsel bileşenleri kodlar. Nükleokapsid kodlayan bölge, tüm dünyada elde edilen izolatlar arasında en muhafazakarı olarak görünmektedir.

C. TEST PRENSİBİ

Mikroplaklar, konzervatif ve immünodominant antijenik belirleyicileri (Çekirdek peptid, rekombinant NS3, NS4 ve NS5 peptidleri) kodlayan "çekirdek" ve "ns" bölgelerinden türetilen HCV'ye özgü antijenler ile kaplıdır.

Katı faz ilk olarak dilüe edilen numune ile muamele edilir ve eğer var ise HCV Ab, antijenleri tarafından yakalanır. Numunenin diğer tüm bileşenlerini yıkadıktan sonra, 2. inkübasyonda bağlanmış HCV antikörlerine, (hem IgG vehem de IgM'e), peroksidaz (HRP) ile işaretlenmiş poliklonal spesifik anti HlgG & M antikörlerinin eklenmesiyle tespit edilir.

Substrat TMB karışımı üzerinde etkili olan katı fazda yakalanan enzim, numunede bulunan anti HCV antikörlerinin miktarı ile orantılı olan bir optik sinyal üretir. Cut-off değeri, optik yoğunlukların HCV antikoru negatif ve pozitif olan sonuçlarla yorumlanmasına olanak tanır.

D. BİLEŞENLER

Kit, 96 test (kod 071067), 192 test (kod 071064) veya 480 test (kod 071068) için gerekli olan reaktifleri içerir.

Mikroplak	1
Negatif Kontrol	1x4 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x2 mL/şişe
Kalibratör	2 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	1x50 mL/şişe
Konjugat	1x16 mL/şişe
Numune Dilüenti	1x50 mL/şişe
Substrat TMB	1x16 mL/şişe
Stop Solüsyonu	1x15 mL/şişe
Assay Diluent	1x8 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	2
Test sayısı	96
Kod	071067

Mikroplak	2
Negatif Kontrol	2x4 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x4 mL/şişe
Kalibratör	3 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	2x50 mL/şişe
Konjugat	2x16 mL/şişe
Numune Dilüenti	2x50 mL/şişe
Substrat TMB	2x16 mL/şişe
Stop Solüsyonu	2x15 mL/şişe
Assay Diluent	2x8 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	4
Test sayısı	192
Kod	071064

Mikroplak	5
Negatif Kontrol	1x20 mL/şişe
Pozitif Kontrol	1x10 mL/şişe
Kalibratör	7 şişe
Yıkama Bufer Konsantresi 20x	5x50 mL/şişe
Konjugat	2x40 mL/şişe
Numune Dilüenti	5x50 mL/şişe
Substrat TMB	2x40 mL/şişe
Stop Solüsyonu	2x40 mL/şişe
Assay Diluent	1x40 mL/şişe
Plak Kapatma Folyoları	10
Test sayısı	480
Kod	071068

1. Mikroplak

12 strip-8 mikrokuyucuklu; Çekirdek peptid, rekombinant NS3, NS4 ve NS5 peptidleri ile kaplı . Plaklar, kurutuculu alüminyum bir poşet içerisinde kapalı haldedir.

Poşeti açmadan önce, mikroplağın oda sıcaklığına (+18...24°C) ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat). Kullanılmayan stripler içinde kurutucu olanpoşetine konmalı, poşet sızdırmayacak şekilde kapatılmalı ve +2...8°C'ye geri koyulmalıdır.

2. Negatif Kontrol

Kullanıma hazır. 10 mM Na-sitrat tamponu pH 6.0 ± 0.1, protein bazlı % 2 kazein ve koruyucu olarak% 0.1 Proclin 150 içerir. Negatif kontrol, zeytin yeşili renk kodludur.

3. Pozitif Kontrol

Kullanıma hazır. % 1 keçi serum proteinleri, HCV pozitif insan antikörleri, 10 mM Na-sitrat tamponu pH 6.0 ± 0.1, % 0.5 Tween 20,% 0.09 Na-azid ve koruyucu olarak%

0.1 Proclin 150 içerir. Pozitif kontrol, koyu yeşil renk kodludur.

Önemli not: Pozitif Kontrol'de canlı patojenlerin olmadığına dair tam olarak bir garanti verilemez, ve bu nedenle reaktif, iyi laboratuvar uygulamaları uyarınca potansiyel olarak biyolojik tehlikeye maruz kalmayacak şekilde ele alınmalıdır.

4. Kalibratör

Liyofilize kalibratör. Etiketle belirtilen EIA sınıfı su ile çözülmelidir. NIBSC Çalışma Standardı 06 / 188-006 kodunda , 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1, 0.3 mg / mL gentamisin sülfatta kalibre edilmiş fetus sıgır serumu proteinleri, HCV insan antikorları ve koruyucu olarak% 0.1 Proclin 150 içerir.

Önemli not: Kalibratör'de canlı patojenlerin olmadığına dair tam olarak bir garanti verilemez, ve bu nedenle reaktif, iyi laboratuvar uygulamaları uyarınca potansiyel olarak biyolojik tehlikeye maruz kalmayacak şekilde ele alınmalıdır.

Not: Şişenin içeriğini çözmek için gereken hacim, lottan-lota değişebilir. Lütfen etiket üzerinde belirtilen doğru hacmi kullanın.

5. 20x Konsantre Solüsyon

20x konsantre solüsyon. Dilüe edilen wash solution (dilüe wash solution) 10 mM fosfat tamponu pH 7.0 ± 0.2,% 0.05 Tween 20 ve% 0.05 Proclin 150 içerir.

Dilüe edilmiş wash solüsyonu, +2...8°C'de 1 hafta stabildir.

6. Conjugate

Kullanıma hazır, kırmızı renk kodlu reaktif. İnsan IgG ve IgM'ine karşı Horseradish Peroxidase konjuge keçi poliklonal antikorları, %5 BSA, 10 mM Citrate buffer pH 6.4 ± 0.1, 0.1% Proclin ve koruyucu olarak, %0.005 Tween içerir.

7. Substrat TMB

Kullanıma hazır bileşen. 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine veya TMB ve 0.02% hydrogen peroxide veya H₂O₂ içerir. Kullanmadan önce iyice karıştırın.

Not: Güçlü ışığa duyarlı olduğundan, ışıktan korunaklı olarak saklanmalıdır.

8. Assay diluent

Kullanıma hazır bileşen. Plaktaki nuunelerin, kontrollerin ve numunelerin etkileşimi bloklamak üzere ön işlem için %0.1 Proclin 150 ve %0.09 Na azide içeren 10 mM tris tamponlu solüsyon pH 8.0 ± 0.1, keç, serumu içerir.

9. Stop Solüsyonu

Kullanıma hazır bileşen.

0.3 M H₂SO₄ solüsyonu içerir. Kullanımadan önce iyice karıştırın.

10. Sample Diluent

Kullanıma hazır reaktif, koyu yeşil kodlu reaktif.

% 1 casein, 10 mM Na-citrate buffer pH 6.0 ± 0.1 ve koruyucu olarak %0.1 Proclin 150 içerir.

Numuneyi dilüe etmek için kullanılır.

Not: Dilüent, numunenin varlığında rengi, szeytin yeşilinden, koyu mavimsi yeşil renge dönüştürür.

E. GEREKEN AMA SAĞLANMAYAN MALZEMELER

1. Kalibre edilmiş Mikropipetler (200 µL ve 10 µL) ve tek kullanımlık plastik uçlar.
2. EIA sınıfı su (bidistile veya deiyonize, dezenfektanlar olarak kullanılan oksitleyici kimyasalları uzaklaştırmak için işlenmiş kömür).
3. 60 dakikalık veya daha yüksek olan zamanlayıcı (laboratuvar saati)
4. Kurutma kağıdı.
5. +37°C'lik sıcaklığa erişebilen, kalibre edilmiş termostatlı ELISA mikroplak inkübatörü.
6. 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm (blanking) filtrelili, kalibre edilmiş ELISA mikrokuyucu okuyucu.
7. Kalibre edilmiş ELISA mikroplak yıkayıcı.
8. Vorteks ya da benzeri karıştırma araçları.

F. UYARILAR VE ÖNLEMLER

1. Kit, laboratuardan sorumlu bir tıp doktorunun gözetiminde, yalnızca nitelikli ve eğitimli teknik personel tarafından kullanılmalıdır. Paketin içindeki prospektüs, ürünü kullanmadan önce dikkatlice okunmalıdır.
2. Ürünü kullanmadan önce, Güvenlik Bilgi Formunu (SDS) dikkatlice okuyun.
3. Kit, kan birimlerinin ve kan bileşenlerinin taranması için kullanıldığında, bu tür analizleri gerçekleştirmek için o alandaki ulusal otorite tarafından sertifikalandırılmış, nitelikli bir laboratuarda (Sağlık Bakanlığı veya benzeri kuruluş) kullanılmalıdır.
4. Tahlili yapan tüm personel, koruyucu laboratuvar giysileri ve gözlüğü ile, pudrasız eldiven kullanmak zorundadır. Delici (iğne) veya kesici (bıçak veya benzeri) aletler kullanılmamalıdır. İlgili tüm personel, Atlanta, ABD Hastalık Kontrol Merkezi tarafından tavsiye edilen ve Ulusal Sağlık Enstitüsünün yayınında bildirilen biyogüvenlik prosedürleri konusunda eğitilmelidir: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Numuneler ile temas halindeki tüm personel HBV ve HAV için güvenli ve etkili olan aşılarda, aşılama olmalıdır.
6. Laboratuvar ortam, tüpleri - mikro plakları açarken ve testi çalışırken, toz veya havadan kaynaklanan mikrobiyal ajanlar gibi kontaminantları önleyecek şekilde kontrol edilmelidir. Substrate Solution (TMB)'ı kuvvetli ışıktan koruyun ve testin yapıldığı tezgahın titremesini/sallanmasını önleyin.
7. Teslim aldıktan sonra kiti +2...8°C'de sıcaklığı kontrol edilen bir buzdolabına veya soğuk odaya koyun.
8. Lotları farklı olan kit bileşenlerini birbirleriyle kullanmayın. Aynı lotlu kit bileşenlerin birbirleri arasında kullanılması önerilir.
9. Reaktiflerin berrak olup olmadığını ve görünür partikül veya agregalar içerip-içermediğini kontrol edin. Değilse, laboratuvar amirinden kitin değiştirilmesi için gerekli prosedürleri başlatmasını isteyin.
10. Tek kullanımlık pipet ucu kullanarak ve her numuneden sonra bunları değiştirerek serum / plazma numuneleri arasında çapraz kontaminasyonu engelleyin.

11. Tek kullanımlık pipet uçları kullanarak ve her birinin kullanımı arasında değiştirerek, kit reaktifleri arasındaki kontaminasyonu engelleyin.
12. Kiti, ambalajında ve şişe etiketlerinde son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
13. Tüm numuneleri, potansiyel bulaşıcı olarak ele alın. Tüm insan serum örnekleri, Atlanta Enstitüsü, Atlanta, ABD tarafından Sağlık Enstitüsünde yayınlanan bildiriye belirtilenlere uygun olarak, Biyogüvenlik Seviyesi 2 olarak kullanılmalıdır. "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
14. Sıvı bileşenlerin hazırlanmasında veya bileşenlerin otomatik iş istasyonlarına aktarılmasında çapraz kontaminasyonu önlemek için, tek kullanımlık plastik malzeme kullanılması önerilir.
15. Kitin kullanımı sırasında çıkan atıklar, kimyasal ve biyolojik laboratuvar atıklarına ilişkin ulusal direktiflere ve kanunlara uygun olarak atılmalıdır. Özellikle, yıkama prosedüründen, kontrol ve numune kalıntılarında çıkan sıvı atıklara, potansiyel olarak enfektif materyal olarak muamele edilmeli ve atmadan önce inaktive edilmelidir. 16-18 saat boyunca % 10'luk r ev tipi çamaşır suyu ile muamele etmek ya da ısı inaktivasyonu için 121 ° C'de 20 dakika otoklavlama, önerilen inaktivasyon prosedürleridir.
16. Numunelerin ve işlem esnasındaki sıvıların kazara dökülmeler, kâğıt havlular ile adsorbe edilmelidir ve ardından çamaşır suyu ile temizlenmelidir. Temizlemede kullanılan tüm malzemeler (kağıt havlular v.s.) kullanıldıktan sonra laboratuvar / hastane atığına uygun kaplarda atılmalıdır.
17. Stop solüsyonu 0.3 M sülfirik asit içerir. Cilt ve göz temasından kaçının. Temas halinde, derhal bol su ile yıkayın.
18. Koruyucu olarak Sodyum azid içeren reaktif solüsyonlarını, yerel, eyalet ve ulusal yönetmeliklere göre atın. Azid içeren reaktifleri atarken, bol miktarda su kullanarak yıkayın. Sodyum azid, kurşun veya bakır borular/tesisat ile uzun süre temas ettiğinde, patlayıcı bileşikler oluşturabileceğinden dikkatle atın.
19. Numunelerin veya kit reaktiflerinin çalışıldığı alanlarda sigara içmeyin, birşey yiyip-içmeyin veya kozmetik kullanmayın.
20. Kitin kullanımı nedeniyle oluşan diğer atık maddeler (örneğin: numuneler ve kontroller için kullanılan pipet uçları, kullanılan mikro plaalar) potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalı ve bu laboratuvar atıklarıyla ilgili ulusal direktiflere ve kanunlara göre atılmalıdır.
21. Ağızınızla pipetleme yapmayınız.

G. NUMUNE: HAZIRLIK VE ÖNERİLER

1. Kan, venpunktür teknikleriyle aseptik koşullarda alınmalıdır. Numune (plazma veya serum), klinik laboratuvar analizlerinde kullanılmak üzere standart teknikler kullanılarak hazırlanmalıdır. Numunenin sitrat, EDTA ve heparin ile hazırlanmasında herhangi bir etki/sorun gözlenmemiştir.
2. Numunelere koruyucu maddeler eklemeyin; özellikle de sodyum azid konjugatın enzimatik aktivitesini etkileyerek yanlış negatif sonuçlar çıkmasına neden olur.
3. Sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için, numunelerin kodlarla veya isimlerle açıkça

tanımlanması gerekir. Kit, kan ünitelerinin taranması için kullanıldığında, barkod etiketleme ve elektronik okuma önerilir.

4. Hemolizli (kırmızı) ve görünür şekilde hiperlipemik ("sütlümsü") numuneler, yanlış sonuçlar üretebileceği için atılmalıdır. Fibrin veya ağır partiküllerin veya mikrobiyal filamentlerin ve cisimlerin kalıntılarını içeren numuneler de yanlış sonuçlara neden olabilecekleri için atılmalıdır.
5. Serum ve plazma, toplandıktan sonra beş gün süreyle +2...8°C'de saklanabilir. Daha uzun depolama süreleri için, numuneler birkaç ay boyunca -20°C'de dondurularak depolanabilir. Dondurulmuş olan numune, birden fazla kez dondurulmamalı / çözülmemelidir; bu işlem, test sonucunu etkileyebilecek partiküller oluşturabilir.
6. Partikül varsa numuneyi, 2.000 devirde 20 dakika santrifüjleyin veya 0.2-0.8u filtre kullanarak filtreleyin.

H. BİLEŞENLERİN HAZIRLANMASI VE UYARILAR

Açılmış bir kit üzerinde yapılan bir araştırma, ürünün 1 kez daha tekrar kullanılmasına kadar, 6 ay süreyle herhangi bir aktivite kaybı olmadığını göstermiştir.

1. Mikroplaklar:

Poşeti açmadan önce, mikroplağın oda sıcaklığına ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat). Kurutucu maddenin koyu yeşil renge dönüşmediğinden emin olun; bu üretimde bir hata olduğunu gösterir. Böyle bir durumda, Adaltis müşteri servisini arayın.

Kullanılmayan stripler, içinde kurutucusu olan alüminyum poşetinin içerisine koyulmalı ve sıkıca kapatılarak +2...8°C'de saklanmalıdır. Poşeti bir kez açtıktan (ilk açılış) sonra kalan stripler, poşetteki koruyucunun göstergesi sarıdan yeşile dönene kadar stabildir.

2. Negatif Kontrol:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

3. Pozitif Kontrol:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın. Bu bileşen, potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalıdır.

4. Kalibratör

Liyofilize şişenin içeriğini, etiketinde belirtilen EIA dereceli su miktarı ile dikkatlice çözün. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Bu bileşen, potansiyel enfeksiyöz olarak ele alınmalıdır. **Not:** Kalibratör çözüldüğünde stabil değildir. -20 ° C'de porsiyonlanmış halde saklayın.

5. 20x Konsantre Solüsyon (50 mL):

20x konsantre solüsyonun tüm içeriği, 1000 mL'ye kadar (hacim, etikette belirtilmektedir) EIA dereceli su ile dilüe etmeli ve kullanmadan önce hafifçe ters-yüz ederek karıştırılmalıdır. Şişede bazı tuz kristalleri olabilir, bu yüzden solüsyonu hazırlarken tüm içeriği çözmeye özen gösterin. Hazırlama esnasındaki kabarcık oluşumu, yıkama döngülerinin verimliliğini etkileyebileceğinden köpürmeden kaçının.

Not: Dilüe edilmiş wash solüsyonu, +2...8°C'de 1 hafta stabildir.

6. Conjugate:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Sıvıyı oksitleyici kimyasal maddeler, havadaki toz veya mikroplarla oluşabilecek kontaminasyon engellenmelidir. Bu bileşenin transferinde sadece plastik, mümkününde steril tek kullanımlık kaplar kullanılmalıdır.

7. Substrat TMB:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

Oksitleyici kimyasal maddeler içeren sıvı, havadaki toz veya mikroplarla oluşabilecek kontaminasyon engellenmelidir. Güçlü aydınlatmaya, oksitleyici maddelere ve metalik yüzeylere maruz bırakmayın. Bu bileşenin transferinde sadece plastik, mümkününde steril tek kullanımlık kaplar kullanılmalıdır.

8. Assay Diluent:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

9. Stop Solüsyonu:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

10. Sample Diluent:

Kullanıma hazır. Kullanmadan önce, vorteks ile iyice karıştırın.

I. KİTLE BİRLİKTE KULLANILAN ENSTRÜMANLAR VE ARAÇLAR

1. Mikropipetler, tahlilin gerektirdiği doğru hacmi sağlamak kalibre edilmelidir ve yanlışlıkla numune veya kitin bileşenleri ile temas edebilecek bu parçalar düzenli olarak dekontamine (ev tipi alkol, çamaşır suyu % 10, hastane sınıfı dezenfektanlar ile) edilmelidir. Ayrıca, % 1'lik hassasiyet ve % \pm 2'lik doğrulukla çalışabilmeleri için düzenli olarak bakımları yapılmalıdır. Döküntülerin veya kit bileşenlerinin kalıntılarının dekontaminasyon işlemi, düzenli olarak yapılmalıdır.
2. ELISA inkübatör cihazı + 37 ° C'ye (tolerans \pm 0.5 ° C) ayarlanmalıdır ve doğru sıcaklığın muhafaza edildiğinden emin olmak için düzenli olarak kontrol edilmelidir. ELISA testlerinin inkübasyonu için, cihazın onaylanmış olması koşulu ile, kuru inkübatörler ve su banyoları inkübasyon için uygundur.
3. ELISA yıkayıcı, tahlilin genel performansı için son derece önemlidir. Yıkayıcı onaylanmış ve doğru bir şekilde optimize edilmiş olmalıdır. Genellikle 4-5 yıkama döngüsü (aspirasyon + 350 μ L / kuyucuk yıkama solüsyonu = 1 devir) tahlilin beklendiği gibi yapıldığından emin olmak için yeterlidir. Döngüler arasında 20-30 saniyelik ıslatma süresi önerilir. Numaralarını doğru bir şekilde ayarlamak için, kontrolleri / kalibratör ve negatif ve pozitif referans numuneleri ile testin yapılmasını ve aşağıdaki "İnternal Kalite Kontrolü" bölümlerinde belirtilen değerlerin eşleşmesini kontrol etmeniz öneririz. Dağıtılan hacimlerin kalibrasyonu ve yıkayıcının bakımı (iğnelerin dekontaminasyonu ve temizlenmesi) imalatçının talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

4. İnkübasyon süreleri \pm % 5'lik toleransa sahiptir.

- ✓ Kısa İnkübasyon Metodu (43 dakika ile 47 dakika arasında birinci ve ikinci inkübasyon toleransı, 14 ile 16 dakika arası üçüncü inkübasyon toleransı).
- ✓ Standart İnkübasyon Metodu (57 dakika ile 63 dakika arasında 1. inkübasyon toleransı, 29 ve 31 dakika arasındaki ikinci ve üçüncü inkübasyon toleransı).

5. ELISA mikropipet okuyucusunda, 450nm'lik okuma filtresi ve kör işlemi için ikinci bir filtre (620-630nm) olmalıdır. Standart performansların (a) bant genişliği \leq 10 nm olmalıdır; (b) 0'dan \geq 2.0'a kadar absorbans aralığı; (c) doğrusalılık \geq 2.0; tekrarlanabilirlik \geq % 1 olmalıdır. Kör işlemi (blanking), "Test Prosedürü" bölümünde tarif edildiği gibi yapılır. Okuyucunun optik sistemi, doğru optik yoğunluğun ölçülmesini sağlamak için düzenli olarak kalibre edilmelidir. Üreticisinin talimatlarına göre muhafaza edilmelidir.
6. ELISA otomatik çalışma cihazı kullanırken, tüm kritik adımlar (bakım, inkübasyon, yıkama, okuma, çalkalama, veri işleme) Bölüm O "İç Kalite" de yazılı olan değerlerle eşleşecek şekilde dikkatlice ayarlanmalı, kalibre ve kontrol edilmeli ve düzenli olarak servise hizmeti alınmalıdır. Test protokolü ünitenin işletim sistemine yüklenmeli ve yıkayıcı ve okuyucu valide edilmelidir. Ayrıca, cihazın sıvı çalışma kısmı (dağıtım ve yıkama) doğrulanmalı ve doğru bir şekilde ayarlanmalıdır. Numunelerin dağıtılması ve yıkanması için kullanılan iğnelerin tıkalı/kirli olup olmadığına özellikle dikkat edilmelidir. Hatalı sonuçlara yol açan kuvvetli reaktif numunelerden dolayı, komşu kuyucuklarda kontaminasyon olasılığını en aza indirmek için kontrol edilmelidir. Kan taramaları için ve test edilecek numune sayısı işlem başına 20-30 üniteyi aştığında, otomatik ELISA analizörlerinin kullanılması tavsiye edilir.

L. TAHLİL ÖNCESİ KONTROLLER VE İŞLEMLER

1. Kit kutusunun dış etiketi üzerine basılan kitin son kullanma tarihini kontrol edin. Kullanım süresi bitmişse, kullanmayın.
2. Sıvı bileşenlerin çıplak gözle görülebilir parçacıklar veya agregatlar tarafından kontamine olmadığını kontrol edin. Steril şeffaf bir plastik pipetle küçük bir hacim aspire ederek Substrat Solüsyonunun rensiz veya soluk mavi olup olmadığını kontrol edin. Nakliye esnasında kırılma olmadığından ve kutunun içinde sıvı dökülmediğinden emin olun. Mikropipet içeren alüminyum poşetin delinmediğinden veya hasar görmediğinden emin olun.
3. 20x konsantrasyon Wash Buffer'ın tüm içeriğini yukarıda açıklandığı gibi dilüe edin.
4. Kalibratörü yukarıda anlatıldığı gibi çözün.
5. Diğer tüm bileşenlerin oda sıcaklığına ulaşmasını sağlayın (yaklaşık 1 saat boyunca) ve daha sonra açıklandığı gibi karıştırın.
6. ELISA inkübatörünü + 37°C'ye ayarlayın ve üreticinin talimatlarına göre dilüe edilen yıkama solüsyonuyla çalkalayarak, ELISA yıkayıcıyı hazırlayın. Doğru yıkama döngüsü sayısını, Bölüm I.3'te bulabilirsiniz.
7. Okumadan önce ELISA okuyucusunun en az 20 dakikadır açık olduğunu kontrol edin.

- Otomatik cihaz kullanıyorsanız, cihazı açın, ayarları kontrol edin ve doğru test protokolünü kullandığınızdan emin olun.
- Mikropipetlerin gerekli hacme ayarlandığını kontrol edin.
- Diğer tüm ekipmanın hazır ve kullanıma hazır olup olmadığını kontrol edin.
- Sorun olması durumunda, testi devam ettirmeyin ve amirimize danışın.

M. TEST PROSEDÜRÜ

Test, test edilen tüm numuneler için aynı inkübasyon süresinin aynı olduğuna dikkat ederek, aşağıda belirtilenlere göre gerçekleştirilmelidir.

Test Prosedürü, iki kez inkübasyon prosedürüyle de yapılabilir. Ayarlamamız gereken bir tanesini seçin:

- Standard Inkübasyon (1. inkübasyon 60 dk, 2. ve 3.inkübasyon 30 dk)
- Kısa Inkübasyon (1. ve 2. inkübasyon 45 dk, 3. Inkübasyon 15 dk)

1. Standard Inkübasyon- Manual tahlil:

- Mikrokuyucuk taşıyıcısına, gereken sayıda mikrokuyucuk yerleştirin. 1. Kuyucuğu kör için boş bırakın.
- Üç kuyucuğa 200 µL Negative Control, iki kuyucuğa 200 µL Calibrator ve bir kuyucuğa 200 µL Positive Control pipetleyin. Kontrol ve Kalibratörleri kullanıma hazırdır, dilüe etmeyin !
- Tüm numune kuyucuklarına 200 µL Sample Diluent pipetleyinin; uygun ve tanımlanmış kuyucuklara 10 µL numune pipetleyin. Numunenin dilüentle tamamen karışmasını sağlamak için plağı yavaşça karıştırın; ancak kuyucuklar arasında herhangi bir geçiş ya da sıçrama olmasına izin vermeyin.

Important note: *Check that the colour of the Sample Diluent, upon addition of the sample, changes from light green to dark bluish green, monitoring that the sample has been really added.*

- Tüm kalibratör, kontrol ve numune kuyucuklarına 50 µL Assay Diluent pipetleyin. Numune kuyucuklarının renginin koyu maviye dönüştüğünü kontrol edin.
- Mikroplağı **60 dk, +37°C**'de inkübe edin.
Önemli not: Stripler, sağlanan yapışkan sızdırmayan folyo ile sıkıca kapatılmalıdır(sadece testi manuel yapıyorsanız). Otomatik ELISA cihazı kullanıyorsanız, stripleri kapatmayın.
- Mikroplağı otomatik yıkayıcıyla, Bölüm 1.3'te belirtildiği gibi, 350 µL / kuyucuk olacak şekilde dilüe wash buffer koyup ve aspirasyon yaparak yıkayın.
- Tüm kuyucuklara (kör kuyucuğu olan 1. Kuyucuk hariç) 100 µL Enzyme Conjugate pipetleyin. Tüm kuyucuklara (A1 hariç) kırmızı enkli bileşenin pipetlenmiş olduğunu kontrol edin.

Önemli not: *Kuyucuğun plastik iç yüzeyine, Enzyme Konjugatlı pipet ucu ile dokunmamaya özen gösterin. Kontaminasyon oluşabilir.*

- Mikroplağı **30 dk, +37°C**'de inkübe edin.
- Kuyucukları Bölüm 1.3 te anlatıldığı gibi yıkayın.
- Kör de dahil olmak üzere tüm kuyucuklara, 100 µL

Substrate TMB karışımı pipetleyin. Sonra, mikroplağı oda sıcaklığında (+18...24°C), **30 dk** inkübe edin.

Önemli not: *Güçlü doğrudan aydınlatmaya maruz bırakmayın. Yüksek arka plan oluşabilir.*

- Enzimatik reaksiyonu durdurmak için adım 10'daki ile aynı pipetleme düzenini kullanarak tüm kuyucuklara 100 µL Stop Solution pipetleyin. Stop solüsyonunun eklenmesi ile pozitif kontrol ve pozitif numuneler maviden sarıya döner.
- 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm'de (arka planı çıkarma), bölüm 1.5'te açıklandığı gibi, solüsyonun renk yoğunluğunu ölçün (A1 kör).

Önemli notlar:

- İkinci filtre mevcut değilse, 450nm'de okumadan önce, mikrokuyucuğun alt kısmında parmak izi olmadığından emin olun. Parmak izi, okumada yanlış pozitif sonuçlar doğurabilir.*
- Okuma işlemi, Stop solüsyonunun eklenmesinden hemen sonra, en fazla 20 dakika sonra yapılmalıdır. Yüzeyde kendiliğinden oluşan oksidasyon, daha yüksek bir dara absorbansına neden olabilir.*
- Inkübasyon sırasında 350 ± 150 rpm'de sallanmanın, tahlilin hassasiyetini yaklaşık% 20 arttırdığı kanıtlanmıştır.*

2. Kısa Inkübasyon- Manual tahlil:

- Mikrokuyucuk taşıyıcısına, gereken sayıda mikrokuyucuk yerleştirin. 1. Kuyucuğu kör için boş bırakın.
- Üç kuyucuğa 200 µL Negative Control, iki kuyucuğa 200 µL Calibrator ve bir kuyucuğa 200 µL Positive Control pipetleyin. Kontrol ve Kalibratörleri kullanıma hazırdır, **dilüe etmeyin !**
- Tüm numune kuyucuklarına 200 µL Sample Diluent pipetleyinin; uygun ve tanımlanmış kuyucuklara 10 µL numune pipetleyin. Numunenin dilüentle tamamen karışmasını sağlamak için plağı yavaşça karıştırın; ancak kuyucuklar arasında herhangi bir geçiş ya da sıçrama olmasına izin vermeyin.

Önemli not: *Numunenin eklenmesiyle Sample Diluentinin renginin, açık yeşilden koyu mavimsi yeşil renge dönüşüp-dönüşmediğini kontrol edin, numune gerçekten eklendiyse bu dönüşüm olur.*

- Tüm kalibratör, kontrol ve numune kuyucuklarına 50 µL Assay Diluent pipetleyin. Numune kuyucuklarının renginin koyu maviye dönüştüğünü kontrol edin.
- Mikroplağı **45 dk, +37°C**'de inkübe edin.
Önemli not: Stripler, sağlanan yapışkan sızdırmayan folyo ile sıkıca kapatılmalıdır(sadece testi manuel yapıyorsanız). Otomatik ELISA cihazı kullanıyorsanız, stripleri kapatmayın.
- Mikroplağı otomatik yıkayıcıyla , Bölüm 1.3'te belirtildiği gibi, 350 µL / kuyucuk olacak şekilde dilüe wash buffer koyup ve aspirasyon yaparak yıkayın.
- Tüm kuyucuklara (kör kuyucuğu olan 1. Kuyucuk hariç) 100 µL Enzyme Conjugate pipetleyin. Tüm kuyucuklara (A1 hariç) kırmızı enkli bileşenin pipetlenmiş olduğunu kontrol edin.

Önemli not: Kuyucuğun plastik iç yüzeyine, Enzyme Konjugatlı pipet ucu ile dokunmamaya özen gösterin. Kontaminasyon oluşabilir.

8. Mikroplağı **45 dk, +37°C**'de inkübe edin.
9. Kuyucukları Bölüm 1.3 te anlatıldığı gibi yıkayın.
10. Kör de dahil olmak üzere tüm kuyucuklara, 100 µL Substrate TMB karışımı pipetleyin. Sonra, mikroplağı oda sıcaklığında (+18...24°C), **15 dk** inkübe edin.

Önemli not: Güçlü, doğrudan aydınlatmaya maruz bırakmayın. Yüksek arka plan oluşabilir.

11. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için adım 10'daki ile aynı pipetleme düzenini kullanarak tüm kuyucuklara 100 µL Stop Solution pipetleyin. Stop solüsyonunun eklenmesi ile pozitif kontrol ve pozitif numuneler maviden sarıya döner.
12. 450 nm (okuma) ve mümkünse 620-630 nm'de (arka planı çıkarma), bölüm 1.5'te açıklandığı gibi, solüsyonun renk yoğunluğunu ölçün (A1 kör).

Önemli notlar:

1. İkinci filtre mevcut değilse, 450nm'de okumadan önce, mikrokuyucuğun alt kısmında parmak izi olmadığından emin olun. Parmak izi, okumada yanlış pozitif sonuçlar doğurabilir.
2. Okuma işlemi, Stop solüsyonunun eklenmesinden hemen sonra, en fazla 20 dakika sonra yapılmalıdır. Yüzeyde kendiliğinden oluşan oksidasyon, daha yüksek bir dara absorbandsına neden olabilir.
3. İnkübasyon sırasında 350 ± 150 rpm'de sallanmanın, tahlilin hassasiyetini yaklaşık% 20 arttırdığı kanıtlanmıştır.

N. TAHLİL ŞEMASI

Yöntem	İşlem (Standard İnkübasyon)	İşlem (Kısa İnkübasyon)
Kontroller & Kalibratör	200 µL	200 µL
Sample Diluent & Numune	200 µL diluent.+ 10 µl numune	200 µL diluent.+ 10 µl numune
Assay Diluent	50 µL	50 µL
1. inkübasyon	60 dk (± 3)	45 dk (± 2)
Sıcaklık	+37°C	+37°C
Yıkama Adımı	4-5 döngü	4-5 döngü
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL
2. inkübasyon	30 dk (± 1)	45 dk (± 2)
Sıcaklık	+37°C	+37°C
Yıkama Adımı	4-5 döngü	4-5 döngü
Substrate TMB	100 µL	100 µL
3. inkübasyon	30 dk (± 1)	15 dk (± 1)
Sıcaklık	Oda sıcaklığı (18...24°C)	Oda sıcaklığı (18...24°C)
Stop Solution	100 µL	100 µL
Okuma OD	450/620nm	450/620nm

Aşağıdaki tabloda örnek dağıtım şekli gösterilmiştir (her iki inkübasyon süresi prosedürü için de geçerlidir):

Mikroplak

	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										

Açıklama: BLK = Kör NC = Negatif Kontrol
CAL = Kalibratör PC = Pozitif Kontrol S = Numune

O. INTERNAL KALİTE KONTROL

Kitin OD450 / 620nm değerlerinin beklenen ve aşağıdaki tablodaki gibi olduğunu doğrulamak için, kontroller ve kalibre üzerinden bir kontrol gerçekleştirilir.

Kontrol edin	Gereklilikler
Kör Kuyucuğu	< 0.100 OD 450/620nm
Negatif Kontrol (NC)	< 0.050 ortalama OD450/620nm (kör okumasından sonra)
Kalibratör	S/Co >1.1
Pozitif Kontrol (PC)	>1.000 OD450/620nm

Testin sonuçları yukarıda belirtilen gerekliliklerle uyumluysa, bir sonraki bölüme geçin. Aksi takdirde, devam etmeyin ve aşağıdaki kontrolleri yapın:

Sorunlar	Kontrol
Kör Kuyucuğu > 0.100 OD450nm	1. Substrate Solüsyonunun, analiz sırasında kontamine olup olmadığını;
Negatif Kontrol (NC) > 0.050 OD450nm (kör okumasından sonra)	1. yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; 2. uygun yıkama solüsyonunun kullanıldığını ve yıkayıcıda kullanılmadan önce prime işleminin yapılmış olduğunu; 3. tahlil prosedüründe herhangi bir hata yapılmadığını (negatif kontrol yerine pozitif kontrolün koyulması); 4. negatif kontrolde ya da kontrolün koyulmuş olduğu kuyucuklarda, pozitif numunelerin veya enzim konjugatın dökülmesi/saçılması nedeniyle, kontaminasyon oluşup-oluşmadığını; 5. mikropipetlerin, pozitif numunelerle veya enzim konjugat ile kontamine olmadığını; 6. yıkayıcı iğnelerinin bloke olmadığını veya kısmen tıkanmadığını.

Kalibratör S/Co<1.1	<ol style="list-style-type: none"> ya da 450/630nm'de < 0.800 OD kalibratör eklenmesi esnasında, herhangi bir hata olmadığını (negatif kontrol yerine kalibratörün koyulması); yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; kalibratörde herhangi bir harici kontaminasyon olmadığını;
Pozitif Kontrol (PC) <1.000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> ya da 450/630nm'de < 0.800 OD kontrol eklenmesi esnasında, herhangi bir hata olmadığını (pozitif kontrol yerine negatif kontrolün koyulması); bu durumda, negatif kontrol,> 0.150'lik bir OD450nm değerine de sahip olacaktır. yıkama prosedürünün ve yıkayıcı ayarlarının ön yeterlik çalışmasında doğrulanmış olduğunu; pozitif kontrolde herhangi bir harici kontaminasyon olmadığını;

Yukarıdaki sorunlardan herhangi biri gerçekleşmişse, sorun hakkında daha fazla işlem için amirimize danışın.

P. SONUÇLAR

Test sonuçları, aşağıdaki formül ile belirlenen bir cut-off değeri ile hesaplanır:

$$\text{Cut-Off (Co)} = \text{NC ortalama} + 0.350$$

Test için bulunan değerler, sonuçların sonraki paragrafta anlatıldığı şekilde yorumlanması için kullanılır.

Q. SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Test sonuçları, aşağıdaki tabloya göre numune OD450nm ve cut-off (veya S/Co) oranı olarak yorumlanır:

S/Co	Yorum
< 0.9	Negatif
0.9 - 1.1	Şüpheli
> 1.1	Pozitif

Negatif bir sonuç, hastaya HCV'nin bulaşmamış olduğunu veya kan ünitesinin transfüze edilebileceğini gösterir. Şüpheli sonuç veren hasta, 1-2 hafta sonra tekrardan alınan bir numune ile tekrar test edilmeli ve değerlendirilmelidir. Kan, transfüzyon için kullanılmamalıdır.

Pozitif sonuç, HCV enfeksiyonunun göstergesidir ve bu nedenle hasta buna göre tedavi edilmelidir veya kan ünitesi atılmalıdır.

Önemli notlar:

- Sonuçların yorumlanması, karar verme hataları ve yanlış yorumlama riskini azaltmak için laboratuvar amirinin gözetiminde yapılmalıdır.
- Viral hepatit teşhisi konmadan önce, pozitif çıkan sonuç IgG ve IgM antikorlarını (onay testi) tespit edebilen alternatif bir yöntemle teyit edilmelidir.
- Bu tahlil, ürünün Performans Değerlendirmesinde kanıtlandığı üzere, anti HCV çekirdek antikor serokonversiyonu, bazı diğer ticari kitlerden daha erken tespit edebilmektedir. Bu yüzden, diğer ticari kitlerle doğrulanmayan pozitif bir sonuç, yanlış pozitif

- sonuç olarak ekarte **edilmemelidir!** Numune, yine de bir doğrulama testine tabi tutulmalıdır.
- Tahlil IgM antikorlarını da tespit edebildiğinden, anti HCV antikorlarının tespiti için diğer ticari ürünler ile - enzim izleyici formülasyonunda anti hlgM konjugatı olmayan ve dolayısıyla IgM reaktivitesi eksik olan - bazı farklı sonuçlar doğabilir. HCV antikorları için numunenin gerçek pozitifliği, daha sonra HCV enfeksiyonunun teşhisi için önemli olan, IgM reaktivitesini inceleyerek doğrulanmalıdır.
 - Test sonuçları laboratuardan başka bir departmana iletildiğinde, hatalı veri aktarımını önlemek için dikkat edilmelidir.
 - Viral hepatit enfeksiyonu tanısı alındıktan sonra, uzman bir tıp doktoru tarafından hastaya iletilmelidir.

Hesaplama örneği aşağıda gösterilmiştir:

Aşağıdaki veriler, kullanıcı tarafından elde edilen gerçek rdeğerler yerine kullanılmamalıdır:

Negative Control (Negatif Kontrol): 0.019 – 0.020 – 0.021 OD450nm

Ortalama değer: 0.020 OD450nm'de 0.050'den düşük - Kabul edilir

Positive Control (Pozitif Kontrol): 2.189 OD450nm'de 1.000'De yüksek – Kabul edilir

$$\text{Cut-Off} = 0.020 + 0.350 = 0.370$$

Calibrator: 0.550 - 0.530 OD450nm Ortalama değer: 0.540 OD450nm S/Co = 1.4 S/Co , 1.1'den yüksek – Kabul edilir

Numune 1: 0.070 OD450nm

Numune 2: 1.690 OD450nm

Numune 1 S/Co < 0.9 = negatif

Numune 2 S/Co > 1.1 = pozitif

R.PERFORMANSLAR

Performansların Değerlendirilmesi, Ortak Teknik Şartnamelerde veya CTS'de (98/79 / EC IV.Derg. Mad. 5'in 3. Bölümünde) belirtilenlere ve her iki inkübasyon prosedürüyle (standart ve kısa) uyumlu olarak gerçekleştirilmiştir.

1. TESPİT SINIRI

Testin saptama limiti, anti-HCV için İngiliz Çalışma Standardı, NIBSC kodu 06 / 188-006 ile, kısa inkübasyon tahlili kullanılarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki tabloda, negatif plazma dilüe edildiğinde ve incelendiğinde bu standardın ortalama OD450nm değerleri rapor edilmektedir.

Dilüsyon	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktör	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
Negatif Plasma	0,25	0,20	0,20

Ayrıca, Boston Biomedica Inc., ABD tarafından sağlanan Accurun 1 - serisinden 3000 kodlu numune, aşağıdaki sonuçları gösterenler ile birlikte değerlendirildi:

Accurun 1 serisi	Lot#1	Lot#2	Lot#3
Faktör	S/Co	S/Co	S/Co
1 X	2,90	3,04	3,40

2. TANISAL ÖZGÜNLÜK VE HASSASİYET

Ürünün Performans Değerlendirmesi, toplam 5000'den fazla numune ile yürütülen bir araştırmada gerçekleştirildi

2.1 Tanısal özgünlük

Spesifik analit yokluğunda negatif puanlama, tahlilinin olasılığı olarak tanımlanır. İlk sefer başışta bulunan donörler de dahil olmak üzere, toplam 5000'den fazla rastgele donör incelendi.

Tanısal özgünlük, ABD FDA onaylı bir kit üzerine değerlendirildi.

5043 kan donörü test edildi ve % 99.5 özgünlük alındı. Hastanede yatan 210 hasta, HCV Ab için test edildi; % 99.5'lik tanısal özgünlük bulundu. Bundan başka, potansiyel olarak etkileşim yapan 162 numune (diğer bulaşıcı hastalıklar, E.coli antikor pozitif, viral olmayan hepatik hastalardan etkilenen hastalar, diyaliz hastaları, gebe kadınlar, hemolize, lipemik vb.) test edilerek tanısal özgünlük değerlendirildi. % 100 özgünlük alındı.

Numune hazırlama yönteminden ötürü yanıltıcı reaktivite gözlemlenmemiştir. Farklı standart hazırlama teknikleriyle (sitrat, EDTA ve heparin) hazırlanan plazma ve serum numuneleri, özgünlüğü belirlemek için kullanılmıştır. Dondurulmuş numuneler de, toplamave depolama koşulları nedeniyle oluşan etkileşimleri kontrol etmek için test edilmiştir. Herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir.

2.2 Tanısal Hassasiyet

Spesifik analit varlığında pozitif puanlama, tahlilinin olasılığı olarak tanımlanır. Tanısal hassasiyet, toplam 348 numunede harici olarak değerlendirildi; tanısal hassasiyet % 100 bulunmuştur. Dahili olarak 50'den fazla başka pozitif numune test edildi ve yine % 100'lük bir tanısal hassasiyet değeri sağlandı. Farklı genotiplerin HCV tarafından gerçekleştirilen enfeksiyonlarından kaynaklanan pozitif numuneler de test edildi.

Ayrıca, Boston Biomedica Inc., ABD'den (PHV) ve Zeptometrix, USA'dan temin edilelen serokonversiyon panellerinde de (HCV) incelenmiştir.

Sonuçlar, bazıları için aşağıdaki gibidir:

Panel	N° numuneler	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

Not:

1. Pozitif nuune tespit edildi
2. HCV v.3.0

Son olarak, Ürün, Etablissement Francais Du Sang (EFS), Fransa tarafından sağlanan, aşağıdaki sonuçlar ile birlikte EFS Ac HCV, lot no. 06.140817 panelinde test edilmiştir:

EFS Panel Ac HCV

numune	Lot#1 S/Co	Lot#2 S/Co	Lot#3 S/Co	Ortalama değer
HCV 1	0,53	0,52	0,55	Negatif
HCV 2	3,28	5,91	3,04	Pozitif
HCV 3	2,17	3,18	2,56	Pozitif
HCV 4	2,26	2,23	2,35	Pozitif
HCV 5	6,10	7,06	6,90	Pozitif
HCV 6	1,66	1,77	1,67	Pozitif

3. KESİNLİK

Beş numunede hesaplanan, bir negatif ve dört pozitif, her biri altı ayrı çalışmada 4 tekrarda incelenmiştir. Her iki protokol için de elde edilen kesinlik, eşdeğerdir. Sonuçlar, aşağıdaki gibidir:

Lot-içi sonuçlar: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit –

1. Lot (kısa inkübasyon tahlili)

Numune	Kesinlik - %CV			
	S/Co Ortalama	Çalışma a içi	Çalışmalar arası	Toplam
Negatif	0.03	6.66	10.56	12.48
Pozitif	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

Lot-içi sonuçlar: EIAgen HCV Ab (v.4) Kit –

1. Lot (uzun inkübasyon tahlili)

Numune	Kesinlik - %CV			
	S/Co Ortalama	Çalışma a içi	Çalışmalar arası	Toplam
Negatif	0.04	4.67	12.34	13.19
Pozitif	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

Lotlar arası sonuçlar: ElAgen HCV Ab (v.4) Kit –
1., 2. and 3. Lot (kısa inkübasyon tahlili)

Numune	Kesinlik - %CV		
	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Negatif	8,65	8,29	6,13
Kalibratör	4,98	4,44	5,38
Pozitif	4,11	3,11	1,37

Yukarıdaki tablolarda gösterilen değişkenlik, numunelerin yanlış sınıflandırmasının sonucu değildir.

S. SORUN GİDERME ÖNERİLERİ

Test prosedürüne, spesifikasyonlara ve düzgün pipetleme işlemlerine bağlı kalınması, ayrıca reaktiflerin doğru bir şekilde kullanılması, aşağıdaki hataları önlemeye yardımcı olabilir:

HATA	OLASI NEDENLER / ÖNERİLER
OD, QC'de belirtilen OD'den çok farklı (\pm % 50 OD)	- reaktiflerin yanlış dağıtım hacmi (öneri: Pipet tarafından verilen hacim ile tahlilin gerektirdiği hacim arasındaki uyumu kontrol edin; pipetleri yeniden kalibre edin.) -yanlış sıcaklık veya yanlış inkübasyon süresi (öneri: inkübatör bakımını yapın, inkübasyon başlangıcına dikkat edin) -yıkama veya fotometre okumasında hata (öneri: ilgili cihazların çalışmasını veya ayarlarını kontrol edin) -Substrate Solutions ya da Conjugaten kontaminasyonu (öneri: Sadece tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler kullanın)
Tekrarlanabilirliği düşük olan sonuçlar	-numunelerin veya reaktiflerin dağıtım hacimleri sabit değil. (öneri: pipetlerin hassasiyetini ve pipet ile dağıtılan hacim ile tahlilin gerektirdiği hacim arasındaki uyumu kontrol edin; pipetleri tekrar kalibre edin) -yıkama veya okumada hata (öneri: ilgili cihazların çalışmasını veya ayarlarını kontrol edin) -Substrate kontaminasyonu (öneri: Sadece tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler kullanın) -reaktiflerin degradasyonu ya da kontaminasyonu (öneri: Reaktifler için uygun pipet uçları, tek kullanımlık ve temiz plastik malzemeler, ve yüksek kalitede distile ya da eş değeri su kullanın)
substrat solüsyonunun eklenmesinden sonra, hiçbir kolorimetrik reaksiyon yok	-bazı reaktifler pipetlenmemiş - Conjugate ya da Substrate Solutions'da ağır kontaminasyon -tahlil prosedürünün uygulamasında hata (örneğin, reaktiflerin yanlış bir sırada veya yanlış şişeden kazara pipetlenmesi vb.)
Çok düşük reaksiyon (çok düşük OD)	-İnkübasyon süresi çok kısa, inkübasyon sıcaklığı çok düşük -Yalnız konjugat dilüsyonu

Çok fazla reaksiyon (çok yüksek OD)	-Yalnız konjugat dilüsyonu -inkübasyon süresi çok uzun, inkübasyon sıcaklığı çok yüksek -wash buffer'da kullanılan su kalitesi yetersiz (düşük dereceli deiyonizasyon) -yetersiz yıkama (konjugatlar düzgün giderilmemiş)
açıklanamayan aykırılıklar	-pipetlerin, pipet uçlarının ya da kapların kontaminasyonu -değişken ve yetersiz yıkama (konjugatlar düzgün pipetlenmemiş)
çalışma içi çok yüksek%CV	-kullanım öncesi Oda Sıcaklığı %CV için reaktifler ve/veya striplere ön ısıtma yapılmamış - plak yıkayıcı, doğru yıkama yapmıyor (öneri: yıkama kafasını temizleyin)
çalışmalar arası çok yüksek%CV	-inkübasyon koşulları sabit değil (zaman, sıcaklık) -Kontrol ve numuneler aynı zamanda dağıtılmamış (aynı aralıklarla) (pipetleme sırasını kontrol edin) -kişi ile ilgili varyasyonlar

T. OTOMASYON

Bu Kullanım Talimatında anlatılan prosedürler, sadece manuel test içindir. Otomatik cihazları kullanırken, cihazın üreticisi tarafından sağlanan kullanım kılavuzunda bulunan talimatları izleyin. Laboratuvarlar, bu ürünün otomatik sistemler ile uyumluluğunu kanıtlamak için, onaylı geçerlilik prosedürlerine uymalıdır.

U. SINIRLAMALAR

Tekrarlanabilir yanlış pozitif sonuçlar, RIBA veya benzeri doğrulama teknikleri ile teyit edilmedi, normal popülasyonun% 0.1'inden az olarak değerlendirildi. Çözündükten sonra fibrin parçacıkları veya agregalar içeren dondurulmuş numunelerin bazı yanlış sonuçlar verdiği görülmüştür.

BIBLIYOGRAFI

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. Fingerhood 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.

Contract No:Co2403079

Date:09/03/2024

Letter of Authorization

Manufacturer: Atlas Medical GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3,
15827Blankenfelde-Mahlow, Germany
Tel: +49 33 70 83 55 030
Email: amug@atlas-medical.com

Regulatory Office: William James House, Cowley Road, Cambridge, CB4 0WX, UK
Tel: +44 1223 858 910
Fax: +44 1223 858 524
Email: info@atlas-site.co.uk

Middle East Site: Sahab Free Zone Area
P. O. Box 204, Amman 11512, Jordan.
Tel.: +962 6 4026468
Fax: +962 6 4022588
Email: info@atlas-medical.com

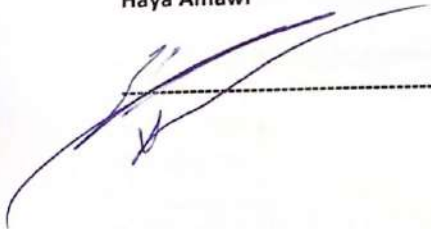
Agent: San Medico
Republic of Moldova, city Chisina
+37368228890

Atlas Medical, hereby appoint the above mentioned agent to import, register and distribute Atlas Medical Products in Maldova

Appointment Conditions:

1. This appointment is valid for 3 year from the above mentioned date.
2. Either Party can cancel this appointment by giving the other party a 60 day notice.

On behalf of the Manufacturer
General Manager
Haya Amawi



GMED certifie que le système de management de la qualité développé par
GMED certifies that the quality management system developed by

ATLAS MEDICAL GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow GERMANY

pour les activités
for the activities

Conception et développement, fabrication et vente de dispositifs médicaux de diagnostic in vitro .

Design and Development, Manufacturing and Sales of in vitro diagnostic medical devices.

réalisées sur le(s) site(s) de
performed on the location(s) of

Voir addendum

See addendum

est conforme aux exigences des normes internationales
complies with the requirements of the international standards

ISO 13485: 2016

Début de validité / Effective date October 9th, 2023 (included)

Valable jusqu'au / Expiry date : October 8th, 2026 (included)

Etabli le / Issued on : October 9th, 2023

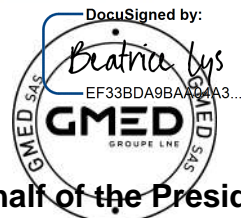


CERTIFICATION DE SYSTEMES DE MANAGEMENT
Accréditation n°4-0608
Liste des sites accrédités
et portée disponible sur
www.cofrac.fr

GMED N° 36655-2

Ce certificat est délivré selon les règles de certification GMED / This certificate is issued according to the rules of GMED certification

Renouvelle le certificat 36655-1



On behalf of the President
Béatrice LYS
Technical Director

Ce certificat couvre les activités et les sites suivants :
This certificate covers the following activities and sites:

French version :

Conception et développement, fabrication et vente de dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* à usage professionnel et/ ou d'autodiagnostic, dans les domaines du groupage sanguin, de la microbiologie, de la biochimie, de la toxicologie, de l'oncologie, de la cardiologie, de l'histologie, de l'endocrinologie et des maladies infectieuses, dans les techniques d'Agglutination/ ELISA/ Tests rapides/ Colorimétrie/ Disques antibiotiques.

English version:

Design and Development, Manufacturing and Sales of in vitro diagnostic medical devices for professional use and/or for self-testing, in the field of Immunohematology, Microbiology, Biochemistry, Toxicology, Oncology, Cardiology, Histology, Endocrinology Biosensors and Infectious diseases, in techniques of Agglutination/ ELISA/ Rapid tests/ Colorimetry/Antibiotic disks.

**ATLAS MEDICAL GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow
GERMANY**

French version:

Siège social, responsable de la mise sur le marché

English version:

Headquarter, legal manufacturer

**Sahab Industrial Zone Area
King Abdullah II Industrial City
Amman 11512
JORDAN**


French version:

Conception, fabrication et contrôle final

English version:

Design, manufacture and final control

2 sites / 2 sites

DocuSigned by:
Beatrice Lys
FF33BDA80AA04A3...


**On behalf of the President
Béatrice LYS
Technical Director**

CE Declaration of Conformity

Name and address of Manufacturer	Atlas Medical GmbH Ludwig-Erhard-Ring 3, 15827 Blankenfelde-Mahlow Germany . Tel: +49(0)33708355030 Email: info@atlas-medical.com
---	--

Atlas Medical GmbH declared our his own responsibility that the following IVD medical devices:

Product Code	Product Name	GMDN code
8.00.19.0.0050	Atlas TPHA Kit , 50 Tests	51819
8.00.19.0.0100	Atlas TPHA Kit , 100 Tests	51819
8.00.19.0.0200	Atlas TPHA Kit , 200 Tests	51819

Meets the essential requirments of In Vitro Diagnostic Medical Devices Directive 98/79/EC Annex I

And

EN ISO 13485 :2016 , EN 18113-1, -2,:2011, EN ISO 15223:2016
 EN ISO 14971:2019, EN ISO 23640:2015, ISO 2859/1:1999,
 EN ISO 13612:2002, EN ISO 13641:2002 , EN ISO 62366-1+A1:2020.

IVD Categorization	Directive 98/79, Other IVDs (Non-annex II, non-self-test).
Conformity Assesment Route	Directive 98/79/EC , Annex III.
Name , Address and Identification number of notified body	N/A

Date of issuance:	06.September.2021
Place	Atlas Medical GmbH
Signed by:	Amani AL-Habahbeh 
Position :	Regulatory Affairs Manager


Atlas Medical GmbH
 Ludwig - Erhard Ring 3
 15827 Blankenfelde - Mahlow
 Tel. (0049) 33708 - 355030



TPHA TEST KIT

A passive particle agglutination assay for the qualitative and semi-quantitative detection of IgG and IgM antibodies to *Treponema pallidum*

IVD For *in vitro* diagnostic and professional use only

2°C  8°C
Store at 2° to 8° C



INTENDED USE

TPHA test kit is designed for the detection of antibodies to *Treponema pallidum* (IgG and IgM antibodies) in human serum or plasma based on the principle of passive particle agglutination.

INTRODUCTION

Syphilis is a venereal disease caused by the spirochaete microorganism *Treponema pallidum*. As this organism cannot be cultured on artificial media the diagnosis of syphilis depends on the correlation of clinical data with the specific antibody demonstrated by serological tests. Serological screening tests for syphilis using cardiolipin and lecithin as antigens are simple to perform but biological false positive (BFP) reactions occur frequently because the tests use non-treponemal antigens.

The TPI and FTA-ABS tests utilize pathogenic *Treponema pallidum* as the antigen but these tests present some difficulties for routine serodiagnosis. The TPI test requires living pathogenic *T. Pallidum* and the FTA-ABS test requires a fluorescence microscope. Both tests require a high level of expertise.

TPHA test kit has been shown to be a convenient and specific test for the diagnosis of treponemal infection, having specificity similar to that of the TPI test and sensitivity comparable to that of the FTAABS test. It requires minimum laboratory equipment and is very simple to perform.

PRINCIPLE OF THE TEST

Atlas TPHA uses preserved avian erythrocytes coated with extracted antigens of *T. pallidum* (Nichols strain). Specific antibodies present in a sample of plasma or serum bind to these antigens when the sample is incubated with the particles. This causes the particles to agglutinate, then settle to form a characteristic pattern in the test well.

Non-specific reactions are eliminated by the use of absorbents. The assay can be run and interpreted manually or with an auto-analyzer using an agglutination interpretation program.

MATERIALS PROVIDED

- Test cells; avian erythrocytes coated with antigens of *T. Pallidum*.
- Control cells; avian erythrocytes.
- Sample Diluent; Saline solution containing absorbents.
- Positive control; Rabbit antiserum, titer 1/1280, **Pre-diluted**.
- Negative control; Normal Rabbit Serum, **Pre-diluted**.
- Package Insert.

MATERIALS NEEDED BUT NOT PROVIDED

- Micropipettes capable of delivering: 10, 25, 75 and 190µl.
- U-Well microtitration plates.

PACKAGING CONTENTS

REF 8.00.19.0.0200 (2x20 ml Diluent, 2x8.5 ml Control Cell, 2x8.5 ml Test Cells, 1x1 ml Positive Control, 1x1 ml Negative Control)

REF 8.00.19.0.0100 (20ml Diluent, 8.5ml Control Cell, 8.5ml Test Cells, 1ml Positive Control, 1ml Negative Control)

PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic and professional use.
- Protective clothing should be worn when handling the reagents.
- Wash hands and the test table top with water and soap once the testing is done.
- If spillage of reagent occur clean with disinfectant (disinfectant used could be irritable so handle with care).
- The test is for well-trained professional health user not for lay user.
- Do not use these reagents if the label is not available or damaged.
- Do not use the kit if damaged or the glass vials are broken or leaking and discard the contents immediately.
- Test materials and samples should be discarded properly in a biohazard container.
- Reagents and controls contain 0.1% sodium azide as a preservative which is toxic and can be absorbed through the skin when drained, the drains should be thoroughly washed with water.
- The reagent is considered toxic, avoid drinking, ingestion and contact with skin or mucus membrane.

REAGENTS HANDLING

- All the reagents must be allowed to equilibrate to room temperature before use.
- Do not freeze any of the reagents.

REAGENTS STORAGE

- Store bottles upright at **2–8°C**.
- **Do not freeze**
- Do not use after the expiry date.

SAMPLE PREPARATION AND HANDLING

- Use fresh serum or plasma samples free of cells and microbial contamination.
- Samples may be stored at 2-8°C for up to 7 days prior to testing.
- Samples can be frozen at -20°C or lower, these should be thawed and mixed prior to testing.

INTERFERING SUBSTANCES AND LIMITATION OF THE TEST

- Atlas TPHA test kit can be used for serum and plasma samples.
- No interfering substances have been identified.
- Atlas TPHA test kit can cross react with other treponemal infections such as *T. pertenu* and *T. carateum* so positive results should be confirmed by another method.
- In early primary syphilis, occasionally, specific antibodies may not be detected.

PROCEDURES

Bring all reagents and samples to room temperature before use.

Kit controls must be run with each assay.

Ensure Test and Control Cells are thoroughly re-suspended.

QUALITATIVE METHOD

Each sample requires 3 wells of a microtitration plate.

1. Add 190 µl of diluent to Well 1.
2. Add 10 µl sample to Well 1. (Sample dilution 1:20).
3. Using a micropipette, mix contents of Well 1 and transfer 25 µl to Wells 2 & 3.
4. Ensure that the Test and Control Cells are thoroughly suspended. Add 75 µl of control cells to Well 2. Add 75µl of Test Cells to Well 3.
5. Tap the plate gently to mix the contents thoroughly.
6. Incubate 45-60 minutes at 15-30° C. **Caution! Keep the plate away from heat, direct sunlight and any source of vibration.**
7. Read results. Results are stable if the plate is covered and the above precautions are observed.

NOTE

Kit controls must be run in parallel and are diluted and ready for use.

SEMI-QUANTITATIVE TEST

9 wells are needed for each sample.

Sample Dilution (to 1 in 20)

1. Add 190µL of sample diluent to a well.
2. Add 10µL of sample to the same well. Mix thoroughly.

Note: Kit controls are pre-diluted (i.e. diluted 1 in 20)

Titration

1. Leave the first well empty, add 25µL of diluent all other wells in the sequence.

2. Transfer 25µL from step 1 to the first well.
3. Transfer 25µL from step 1 to the second well and mix, then serially dilute along the well sequence, discard the excess 25µL from the final well.

Test

Re-suspend the Test and Control Cells thoroughly

4. Add 75µL of Test Cells to each well.

(Final sample dilution is 1 in 80 – 1 in 10,240)

5. Mix wells thoroughly.
6. Incubate at 15-30°C on a vibration-free surface for 45 - 60 minutes. Caution! Keep the plate away from heat, direct sunlight and any source of vibration.
7. Read results. Results are stable if the plate is covered and the above precautions are observed.

The titer of the sample is the reciprocal of the final positive sample dilution.

INTERPRETATION AND ASSAY VALIDATION

Assay Control

The Kit Controls must be give the correct result; Negative is Negative and Positive is Positive. When the Kit Positive is titrated the expected end point is 640 – 2560.



Positive Equivocal Negative

A sample where the Test Cell well is non-reactive should be considered as **negative for *T.pallidum***. Reactivity less than equivocal is considered negative.

A sample where the Test Cell well is reactive indicates antibodies to *T.pallidum* resulting from a syphilis infection. The sample should be repeated in duplicate. Where 2 or more wells are positive the sample should be considered as **positive for *T.pallidum***.

A repeatable equivocal sample should be considered positive.

Where a sample is reactive in both Test and Control Cells, if the agglutination is greater in the Test Cells, then the sample is considered positive and should be repeated as above.

Where a sample has greater or equal agglutination in the Control Cells then the sample should be absorbed using the following procedure.

Absorption of Non-specific Reactions

1. Add 10µL of sample to 190µL of re-suspended Control Cells, mix thoroughly and leave for 30 minutes.
2. Centrifuge to deposit the cells at a minimum of 1500g for 3 minutes.

3. Add 25µL of supernatant from step 2 to each of 2 wells.
4. Ensure Test and Control Cells are re-suspended.

Add 75µL of Test Cells to the first well.
Add 75µL of Control Cells to the second well.

5. Mix wells thoroughly and Incubate at 15-30°C on a vibration-free surface for 45 - 60 minutes
6. Read and interpret patterns as above.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

A study on 300 donor serum showed 100% specificity. (95% confidence limits 98.8 – 100%).

A study on 300 donor EDTA plasma showed 100% specificity. (95% confidence limits 98.8– 100%).

Sensitivity

A study on 100 syphilis positive samples showed 100% sensitivity. (95% confidence limits 96.6 – 100%).

Analytical sensitivity

Atlas TPHA has an expected sensitivity of between 0.1 and 0.025 IU/ml against the 1st IS for human syphilitic plasma IgG and IgM NIBSC code: 05/132

REFERENCES

1. Rathlev T. - Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic Treponema pallidum WHO/VDT/RES 1965 ; 77 : 65.
2. Tomizawa T, Kasamatsu S. - Haemagglutination tests for diagnosis of syphilis. A preliminary report. Japan. J. Med. Sci. Biol. 19, 305-308, 1966.
3. Rathlev T. - Haemagglutination test utilizing pathogenic Treponema pallidum for the serodiagnosis of syphilis. Br J Vener Dis 1967 ; 43 : 181-5
4. Tomizawa T. Kasamatsu S. Yamaya S. - Usefulness of the haemagglutination test using Treponema pallidum antigen (TPHA) for the serodiagnosis of syphilis. Jap J Med Sci Biol 1969 ; 22 : 341-50.
5. Sequeira P,J,L. Eldridge A,E. - Treponemal Haemagglutination test. Br J Vener Dis 1973 ; 49 : 242-8.
6. Larsen S.A., Hambie E.A., et coll., Specificity, sensitivity and reproducibility among the fluorescent treponemal antibody absorption test, the microhemagglutination assay for Treponema pallidum antibodies, and the hemagglutination treponemal test for syphilis. J. Clin. Microbiol., 1981; 14 : 441 – 445.
7. Wasley G.D. & Wong H.H.Y. Syphilis Serology Priciples and Practice. Oxford Medical Publications 104 - 105

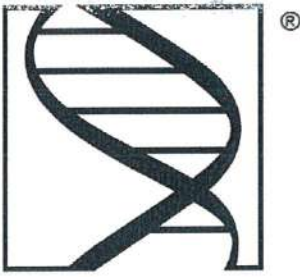


Ludwig-Erhard Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow
Germany
Tel: +49 - 33708 – 3550 30
Email: Info@atlas-medical.com
Website: www.atlas-medical.com

PP12388A01
Rev B (22.02.2024)

	Catalogue Number		Temperature limit
	In Vitro diagnostic medical device		Caution
	Contains sufficient for <n> tests and Relative size		Consult instructions for use (IFU)
	Batch code		Manufacturer
	Fragile, handle with care		Use-by date
	Manufacturer fax number		Do not use if package is damaged
	Manufacturer telephone number		Date of Manufacture
	Keep away from sunlight		Keep dry

***: Indication of the introduced modifications.**



SYNTESSYS



Cert. N.7111/2



Cert. N.8574/2



SYNTESSYS S.R.L. UNIPERSONALE

VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESSYS.IT - WEB WWW.SYNTESSYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESSYS.IT

AUTHORIZATION LETTER

We, **Syntesys S.R.L.** having a registered office at Via G. Galilei 10/3, 35037 Selve di Teolo - PD - Italy, assign **Sanmedico SRL** having a registered office at A.Corobceanu str., apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

This letter is valid till 28.08.2024

Teolo, 28.08.2023



SYNTESSYS S.R.L.
UNIPERSONALE

Via G. Galilei, 10/3 - 35037 Z.I. Selve - Teolo (PD)
C.F./P.I./R.I. PD: 03573950288 - Cap. Soc. 20.700,00 €
Tel. 049 9903866 - Fax 049 9903867

Rinaldo Ruggero
CEO and Legal Representative
SYNTESSYS S.R.L.

Certificate

CISQ/ICIM S.P.A. has issued an IQNet recognized certificate that the organization:

SYNTESYS S.R.L.

Head Office and Operative Unit

Via G. Galilei, 10/1-2-3 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Operative Units

Via G. Galilei, 16/1 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Via San Benedetto, 48/A - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Via G. Galilei, 3 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

has implemented and maintains a/an

Quality Management System

for the following scope:

Trading of products for laboratory analysis. Manufacturing of products for laboratory analysis and sanitary products. Design and production management of sterile swabs for the collection and the preservation of biological samples, also for surgical application, with or without transport medium.

which fulfils the requirements of the following standard:

ISO 9001:2015

Issued on: **2022-06-05**

First issued on: **2013-06-05**

Expires on: **2025-06-04**

This attestation is directly linked to the IQNet Partner's original certificate and shall not be used as a stand-alone document.

Registration Number: **IT-83562**



Alex Stoichitoiu
President of IQNET



Mario Romersi
President of CISQ



This attestation is directly linked to the IQNET Member's original certificate and shall not be used as a stand-alone document.

IQNET Members*:

AENOR Spain **AFNOR Certification** France **APCER** Portugal **CCC** Cyprus **CISQ** Italy **CQC** China **CQM** China **CQS** Czech Republic
Cro Cert Croatia **DQS Holding GmbH** Germany **EAGLE Certification Group** USA **FCAV** Brazil **FONDONORMA** Venezuela **ICONTEC**
Colombia **ICS** Bosnia and Herzegovina **Inspecta Sertifointi Oy** Finland **INTECO** Costa Rica **IRAM** Argentina **JQA** Japan **KFQ** Korea
LSQA Uruguay **MIRTEC** Greece **MSZT** Hungary **Nemko AS** Norway **NSAI** Ireland **NYCE-SIGE** México **PCBC** Poland **Quality Austria**
Austria **SII** Israel **SIQ** Slovenia **SIRIM QAS International** Malaysia **SQS** Switzerland **SRAC** Romania **TSE** Turkey **YUQS** Serbia

* The list of IQNET Members is valid at the time of issue of this certificate. Updated information is available under www.iqnet-certification.com



CISQ is a member of



The International Certification Network
www.iqnet-certification.com

CERTIFICATO N. _____
CERTIFICATE No. **6574/3**

SI CERTIFICA CHE IL SISTEMA DI GESTIONE PER LA QUALITÀ DI
WE HEREBY CERTIFY THAT THE QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OPERATED BY

SYNTESYS S.R.L.

Sede e Unità Operativa

Via G. Galilei, 10/1-2-3 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia
Commercializzazione di prodotti per analisi di laboratorio. Produzione di prodotti per analisi di laboratorio e articoli sanitari. Progettazione e gestione della produzione di tamponi sterili per la raccolta e la conservazione di campioni biologici, anche in ambito chirurgico, con o senza terreno di trasporto.

Unità Operative

Via G. Galilei, 16/1 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
Via San Benedetto, 48/A - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
Via G. Galilei, 3 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
* Magazzino.

È CONFORME ALLA NORMA / IS IN COMPLIANCE WITH THE STANDARD

UNI EN ISO 9001:2015

Sistema di Gestione per la Qualità / Quality Management System

PER LE SEGUENTI ATTIVITÀ / FOR THE FOLLOWING ACTIVITIES

EA: 29 - 14

Commercializzazione di prodotti per analisi di laboratorio. Produzione di prodotti per analisi di laboratorio e articoli sanitari. Progettazione e gestione della produzione di tamponi sterili per la raccolta e la conservazione di campioni biologici, anche in ambito chirurgico, con o senza terreno di trasporto.

Trading of products for laboratory analysis. Manufacturing of products for laboratory analysis and sanitary products. Design and production management of sterile swabs for the collection and the preservation of biological samples, also for surgical application, with or without transport medium.

Riferirsi alla documentazione del Sistema di Gestione per la Qualità aziendale per l'applicabilità dei requisiti della norma di riferimento.
Refer to the documentation of the Quality Management System for details of application to reference standard requirements.

Il presente certificato è soggetto al rispetto del documento ICIM "Regolamento per la certificazione dei sistemi di gestione" e al relativo Schema specifico.
The use and the validity of this certificate shall satisfy the requirements of the ICIM document "Rules for the certification of company management systems" and specific Scheme.

Per informazioni puntuali e aggiornate circa eventuali variazioni intervenute nello stato della certificazione di cui al presente certificato, si prega di contattare il n° telefonico +39 02 725341 o indirizzo e-mail info@icim.it.

For timely and updated information about any changes in the certification status referred to in this certificate, please contact the number +39 02 725341 or email address info@icim.it.

DATA EMISSIONE
FIRST ISSUE
05/06/2013

EMISSIONE CORRENTE
CURRENT ISSUE
05/06/2022

DATA DI SCADENZA
EXPIRING DATE
04/06/2025

Vincenzo Delacqua
Rappresentante Direzione / Management Representative
ICIM S.p.A.

Piazza Don Enrico Mapelli, 75 – 20099 Sesto San Giovanni (MI)
www.icim.it



SGQ N° 004A



www.cisq.com

CISQ è la Federazione Italiana di Organismi di
Certificazione dei sistemi di gestione aziendale. CISQ
is the Italian Federation of management system
Certification Bodies.

Certificate

CISQ/ICIM S.P.A. has issued an IQNet recognized certificate that the organization:

SYNTESYS S.R.L.

Head Office and Operative Unit

Via G. Galilei, 10/1-2-3 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Operative Units

Via G. Galilei, 16/1 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Via San Benedetto, 48/A - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

Via G. Galilei, 3 - Zona Industriale - I-35037 Selve di Teolo (PD)

has implemented and maintains a/an

Quality Management System

for the following scope:

Trading of products for laboratory analysis. Manufacturing of products for laboratory analysis and sanitary products. Design and production management of sterile swabs for the collection and the preservation of biological samples, also for surgical application, with or without transport medium.

which fulfils the requirements of the following standard:

ISO 13485:2016

Issued on: **2022-06-05**

First issued on: **2014-06-21**

Expires on: **2025-06-04**

This attestation is directly linked to the IQNet Partner's original certificate and shall not be used as a stand-alone document.

Registration Number: **IT-93779**



Alex Stoichitoiu
President of IQNET



Mario Romersi
President of CISQ



This attestation is directly linked to the IQNET Member's original certificate and shall not be used as a stand-alone document.

IQNET Members*:

AENOR Spain **AFNOR Certification** France **APCER** Portugal **CCC** Cyprus **CISQ** Italy **CQC** China **CQM** China **CQS** Czech Republic
Cro Cert Croatia **DQS Holding GmbH** Germany **EAGLE Certification Group** USA **FCAV** Brazil **FONDONORMA** Venezuela **ICONTEC**
Colombia **ICS** Bosnia and Herzegovina **Inspecta Sertifointi Oy** Finland **INTECO** Costa Rica **IRAM** Argentina **JQA** Japan **KFQ** Korea
LSQA Uruguay **MIRTEC** Greece **MSZT** Hungary **Nemko AS** Norway **NSAI** Ireland **NYCE-SIGE** México **PCBC** Poland **Quality Austria**
Austria **SII** Israel **SIQ** Slovenia **SIRIM QAS International** Malaysia **SQS** Switzerland **SRAC** Romania **TSE** Turkey **YUQS** Serbia

* The list of IQNET Members is valid at the time of issue of this certificate. Updated information is available under www.iqnet-certification.com



CISQ is a member of



The International Certification Network
www.iqnet-certification.com

CERTIFICATO n. 7111/3
CERTIFICATE No. _____

SI CERTIFICA CHE IL SISTEMA DI GESTIONE PER LA QUALITÀ DI
WE HEREBY CERTIFY THAT THE QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OPERATED BY

SYNTESYS S.R.L.

Sede e Unità Operativa

Via G. Galilei, 10/1-2-3 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia
Commercializzazione di prodotti per analisi di laboratorio. Produzione di prodotti per analisi di laboratorio e articoli sanitari. Progettazione e gestione della produzione di tamponi sterili per la raccolta e la conservazione di campioni biologici, anche in ambito chirurgico, con o senza terreno di trasporto.

Unità Operative

Via G. Galilei, 16/1 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
Via San Benedetto, 48/A - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
Via G. Galilei, 3 - Zona Industriale - 35037 Selve di Teolo (PD) – Italia *
* Magazzino.

È CONFORME ALLA NORMA / IS IN COMPLIANCE WITH THE STANDARD

UNI CEI EN ISO 13485:2016

Sistema di Gestione per la Qualità / Quality Management System

PER LE SEGUENTI ATTIVITÀ / FOR THE FOLLOWING ACTIVITIES

Commercializzazione di prodotti per analisi di laboratorio. Produzione di prodotti per analisi di laboratorio e articoli sanitari. Progettazione e gestione della produzione di tamponi sterili per la raccolta e la conservazione di campioni biologici, anche in ambito chirurgico, con o senza terreno di trasporto.

Trading of products for laboratory analysis. Manufacturing of products for laboratory analysis and sanitary products. Design and production management of sterile swabs for the collection and the preservation of biological samples, also for surgical application, with or without transport medium.

Riferirsi alla documentazione del Sistema di Gestione per la Qualità aziendale per l'applicabilità dei requisiti della norma di riferimento.
Refer to the documentation of the Quality Management System for details of application to reference standard requirements.

Il presente certificato è soggetto al rispetto del documento ICIM "Regolamento per la certificazione dei sistemi di gestione" e al relativo Schema specifico.
The use and the validity of this certificate shall satisfy the requirements of the ICIM document "Rules for the certification of company management systems" and Specific Scheme.

Per informazioni puntuali e aggiornate circa eventuali variazioni intervenute nello stato della certificazione di cui al presente certificato, si prega di contattare il n° telefonico +39 02 725341 o indirizzo e-mail info@icim.it.

For timely and updated information about any changes in the certification status referred to in this certificate, please contact the number +39 02 725341 or email address info@icim.it.

DATA EMISSIONE
FIRST ISSUE
21/06/2014

EMISSIONE CORRENTE
CURRENT ISSUE
05/06/2022

DATA DI SCADENZA
EXPIRING DATE
04/06/2025

Vincenzo Delacqua
Rappresentante Direzione / Management Representative
ICIM S.p.A.

Piazza Don Enrico Mapelli, 75 – 20099 Sesto San Giovanni (MI)
www.icim.it



SGQ N° 004 A



www.cisq.com

CISQ è la Federazione Italiana di Organismi di
Certificazione dei sistemi di gestione aziendale. CISQ
is the Italian Federation of management system
Certification Bodies.



SYNTESYS S.R.L. UNIPERSONALE
VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESYS.IT - WEB WWW.SYNTESYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESYS.IT

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA'
Conformity declaration



Il sottoscritto, Rinaldo Ruggero legale rappresentante della ditta:
The undersigned, Rinaldo Ruggero legal representative of the company:

produttore/manufacturer

SYNTESYS S.r.l.

indirizzo/address

Via G. Galilei, 10/3 35037 Zona Industriale SELVE DI TEOLO (PADOVA) ITALY

O rappresentante il mandatario autorizzato entro la Unione Europea
or representing the authorized mandatary within the European Community

Mandatario autorizzato/authorized mandatary

indirizzo/address

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto/*declares under his own responsibility that the product:*

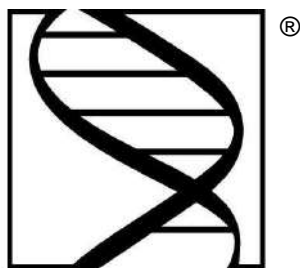
Denominazione/Description	Provetta 12x75 mm 5 ml polipropilene SORWALL s/bordo / <i>Polypropylene cylindrical test tube 12x75 mm 5 ml SORWALL type without rim</i>		
Lotto/Lot	22P2001301	Data di scadenza/Expiry date	05.2032
Codice/Code	318057		
Materiale/Material	Polistirolo / Polystyrene		
Classe di rischio / Risk class	Classe A / Class A		
Numero di registrazione unico (SRN) / Unique registration number (SRN)	IT-MF-000027856		
UDI-DI di base / Basic UDI-DI	805414149PROVETTEDA		

È conforme secondo il Regolamento (UE) 2017/746 concernente i Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro e soddisfa tutti i requisiti specificati. Il dispositivo è stato classificato appartenente alla Classe A secondo la Regola 5 dell'Allegato VIII / It complies with the Regulation (EU) 2017/746 concerning In Vitro Diagnostic Medical Devices and meets all the specified requirements. The device has been classified as belonging to Class A according to Rule 5 of Annex VIII.

Dichiara inoltre che la documentazione tecnica di supporto alla presente dichiarazione di conformità è conservata presso gli uffici dell'azienda e sarà messa a disposizione delle autorità competenti secondo quanto prescritto dall'Art. 10 punto 7 del Regolamento. / *It also declares that the technical documentation supporting this declaration of conformity is kept at the company offices and will be made available to the competent authorities in accordance with the provisions of Art. 10 point 7 of the Regulations.*

Data 21.03.2023

SYNTESYS S.R.L.
UNIPERSONALE
Il Legale Rappresentante
Rinaldo Ruggero



SYNTESSYS



Cert. N.7111/3



Cert. N.6574/3



SYNTESSYS S.R.L. UNIPERSONALE

VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESSYS.IT - WEB WWW.SYNTESSYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESSYS.IT

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' UE
EU Declaration of conformity



Il sottoscritto, Rinaldo Ruggero legale rappresentante della ditta:
The undersigned, Rinaldo Ruggero legal representative of the company:

fabbricante/manufacturer

SYNTESSYS S.r.l.

indirizzo/address

Via G. Galilei, 10/3 35037 Zona Industriale SELVE DI TEOLO (PADOVA) ITALY

O rappresentante il mandatario autorizzato entro la Unione Europea
or representing the authorized mandatary within the European Community

Mandatario autorizzato/authorized mandatary

indirizzo/address

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto/*declares under his own responsibility that the product:*

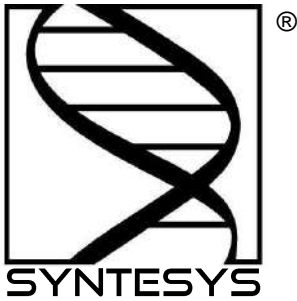
Denominazione/Description	Puntali gialli tipo Gilson da 0 a 200 µl / Yellow tips GILSON type 0-200 µl		
Codice/Code	318260		
Lotto/Lot	4D0912Y	Data di scadenza/Expiry date	09.2025
Classe di rischio / Risk class	Classe A / Class A		
Numero di registrazione unico (SRN) / Unique registration number (SRN)	IT-MF-000027856		
UDI-DI di base / Basic UDI-DI	805414149PUNTALITY		

È conforme secondo il Regolamento (UE) 2017/746 concernente i Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro e soddisfa tutti i requisiti specificati. Il dispositivo è stato classificato appartenente alla Classe A secondo la Regola 5 dell' Allegato VIII / It complies with the Regulation (EU) 2017/746 concerning In Vitro Diagnostic Medical Devices and meets all the specified requirements. The device has been classified as belonging to Class A according to Rule 5 of Annex VIII.

Dichiara inoltre che la documentazione tecnica di supporto alla presente dichiarazione di conformità è conservata presso gli uffici dell'azienda e sarà messa a disposizione delle autorità competenti secondo quanto prescritto dall'Art. 10 punto 7 del Regolamento. / It also declares that the technical documentation supporting this declaration of conformity is kept at the company offices and will be made available to the competent authorities in accordance with the provisions of Art. 10 point 7 of the Regulations.

Teolo (PD), 07.10.2022

SYNTESSYS S.R.L.
UNIPERSONALE
Il Legale Rappresentante
Rinaldo Ruggero



SYNTESYS S.R.L. UNIPERSONALE

VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESYS.IT - WEB WWW.SYNTESYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESYS.IT

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' UE

EU Declaration of conformity



Il sottoscritto, Rinaldo Ruggero legale rappresentante della ditta:
The undersigned, Rinaldo Ruggero legal representative of the company:

fabbricante/manufacturer

SYNTESYS S.r.l.

indirizzo/address

Via G. Galilei, 10/3 35037 Zona Industriale SELVE DI TEOLO (PADOVA) ITALY

O rappresentante il mandatario autorizzato entro la Unione Europea
or representing the authorized mandatary within the European Community

Mandatario autorizzato/authorized mandatary

indirizzo/address

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto/*declares under his own responsibility that the product:*

Denominazione/Description	Puntali neutri tipo Mini-Gilson da 0,1 a 10 µl / Neutral tips MINI-GILSON type 0,1-10 µl bag of 1000 pcs
Codice/Code	318294
Classe di rischio / Risk class	Classe A / Class A
Numero di registrazione unico (SRN) / Unique registration number (SRN)	IT-MF-000027856
UDI-DI di base / Basic UDI-DI	805414149PUNTALITY

È conforme secondo il Regolamento (UE) 2017/746 concernente i Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro e soddisfa tutti i requisiti specificati. Il dispositivo è stato classificato appartenente alla Classe A secondo la Regola 5 dell' Allegato VIII /
It complies with the Regulation (EU) 2017/746 concerning In Vitro Diagnostic Medical Devices and meets all the specified requirements. The device has been classified as belonging to Class A according to Rule 5 of Annex VIII.

Dichiara inoltre che la documentazione tecnica di supporto alla presente dichiarazione di conformità è conservata presso gli uffici dell'azienda e sarà messa a disposizione delle autorità competenti secondo quanto prescritto dall'Art. 10 punto 7 del Regolamento. / *It also declares that the technical documentation supporting this declaration of conformity is kept at the company offices and will be made available to the competent authorities in accordance with the provisions of Art. 10 point 7 of the Regulations.*

Teolo (PD), 22.04.2024

SYNTESYS S.R.L.
UNIPERSONALE
Il Legale Rappresentante
Rinaldo Ruggero



DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' UE EU DECLARATION OF CONFORMITY

conforme all'Allegato IV del Regolamento (UE) 2017/746 "Dispositivi medico-diagnostici in vitro"
according to Annex IV of the Regulation (EU) 2017/746 "In vitro diagnostic medical devices"

fabbricante <i>manufacturer</i>	ROLL S.R.L.		
	articoli per laboratori analisi - disposable labware		
N° registrazione unico SRN	IT-MF-000021270		
indirizzo <i>address</i>	Via Leonardo da Vinci, 24/A 35028 PIOVE DI SACCO (PD) - ITALIA		
telefono <i>phone</i>	+39-0499719511	fax <i>fax</i>	+39-0499719543
		posta elettronica <i>e-mail</i>	roll@tecnomeus.it

Identificazione dei prodotti **PIPETTE PASTEUR 125 MM X VETRINI URINE**

Product identification

Destinazione d'uso **CAMPIONAMENTO DI LIQUIDI BIOLOGICI
SAMPLING OF BIOLOGIC LIQUIDS**

Intended use

BASIC UDI-DI 805938689LABDISPYF

CND W050302010102

numero di catalogo <i>part number</i>	184400	numero di lotto <i>batch number</i>	scadenza <i>expiry date</i>
---	---------------	--	--------------------------------

classificazione dei prodotti **dispositivi non sterili rientranti nella classe A del regolamento 2017/746, conforme alla regola 5**
product identification **non sterile devices included in the class A regulation (EU) 2017/746, according to rule 5**

Si dichiara

sotto la propria esclusiva responsabilità che tutti i dispositivi sopraelencati rispettano le disposizioni applicabili dal regolamento 2017/746 Dispositivi Medico-Diagnostici In Vitro.

La documentazione tecnica richiesta dal succitato regolamento e quella comprovante il rispetto dei Requisiti generali di sicurezza e prestazione di cui all'Allegato I del Regolamento, sono conservati a cura del Fabbricante

Hereby we declare

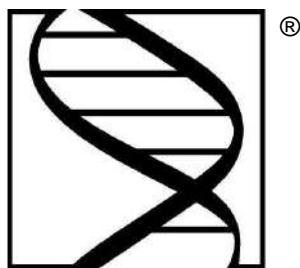
Under our sole responsibility that the above mentioned devices meet the applicable provisions of the Regulation (EU) 2017/746 on "In vitro diagnostic medical devices"

The technical documentation, as required by Regulation (EU) 2017/746 and documents in order to prove conformity to general safety and performance requirements as listed in Annex I, are retained under the premises of the Manufacturer

luogo e data **PIOVE DI SACCO, 30/06/2022**
place and date

firma **ROLL S.R.L.
Quality Assurance**
signature **Giovanni Chiarin**

Giovanni Chiarin



SYNTESSYS



Cert. N.7111/2



Cert. N.6574/2



SYNTESSYS S.R.L. UNIPERSONALE

VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESSYS.IT - WEB WWW.SYNTESSYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESSYS.IT

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA'

Conformity declaration



Il sottoscritto, Rinaldo Ruggero legale rappresentante della ditta:
The undersigned, Rinaldo Ruggero legal representative of the company:

produttore/manufacturer

SYNTESSYS S.r.l.

indirizzo/address

Via G. Galilei, 10/3 35037 Zona Industriale SELVE DI TEOLO (PADOVA) ITALY

O rappresentante il mandatario autorizzato entro la Unione Europea
or representing the authorized mandatary within the European Community

Mandatario autorizzato/authorized mandatary

indirizzo/address

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto/*declares under his own responsibility that the product:*

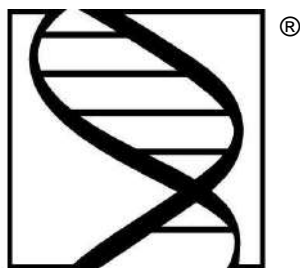
Denominazione/Description	Microprovette tipo Eppendorf in polipr. coniche graduate 1,5 ml c/tappo /Polypropylene microtubes Eppendorf type conical graduated with cap vol. 1,5 ml	
Lotto/Lot	21184378	Data di scadenza/expiry date 06.2026
Codice/Code	318766	
Materiale/Material	Polipropilene/ Polypropylene	
Confezione/Pack	10.000 pezzi/10.000 pcs.	

È conforme alle disposizioni della direttiva 98/79/CE concernente i dispositivi medici diagnostici in vitro e recepito in Italia con D.L. del 08/09/2000 n° 332 allegato 1 (requisiti essenziali) ed è fabbricato in accordo ai requisiti di cui all'Allegato III della sopra citata direttiva / *It meets the CE Directive 98/79 CE about in vitro diagnostic device specifications established by the Italian law n. 332, dated 8th September 2000. The device is made according to the specifications of the III attached of the above-mentioned directive.*

Dichiara inoltre che la documentazione tecnica di supporto alla presente dichiarazione di conformità è conservata presso gli uffici dell'azienda e sarà posta alla disposizione di chi la richiede/ *declares that all technical documents attached to this conformity statement are filed in our company and can be consulted by any authorized body on demand.*

Data 09.09.2021

SYNTESSYS S.R.L.
UNIPERSONALE
Il Legale Rappresentante
Rinaldo Ruggero



SYNTESSYS



Cert. N.7111/3



Cert. N.6574/3



SYNTESSYS S.R.L. UNIPERSONALE

VIA G. GALILEI, 10/3 - 35037 Z.I. SELVE DI TEOLO (PD)
TEL. +39 049 9903866 R.A. FAX +39 049 9903867
C.F./P.I./N.REG.IMP. PADOVA 03573950288
REA PD-320123 - CAP.SOC. 20.700,00€
E-MAIL INFO@SYNTESSYS.IT - WEB WWW.SYNTESSYS.IT
PEC POSTA@PEC.SYNTESSYS.IT

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' UE
EU Declaration of conformity



Il sottoscritto, Rinaldo Ruggero legale rappresentante della ditta:
The undersigned, Rinaldo Ruggero legal representative of the company:

fabbricante/manufacturer

SYNTESSYS S.r.l.

indirizzo/address

Via G. Galilei, 10/3 35037 Zona Industriale SELVE DI TEOLO (PADOVA) ITALY

O rappresentante il mandatario autorizzato entro la Unione Europea
or representing the authorized mandatary within the European Community

Mandatario autorizzato/authorized mandatary

indirizzo/address

Dichiara sotto la propria responsabilità che il prodotto/*declares under his own responsibility that the product:*

Denominazione/Description	Cont. urina 120 ml 55x70 mm polipropilene trasparente con tappo a vite bianco inserito con etichetta / Transparent polypropylene urine container 120 ml with white screw cap and yellow label		
Codice/Code	331162		
Lotto/Lot	22349397	Data di scadenza/Expiry date	11.2027
Classe di rischio / Risk class	Classe A / Class A		
Numero di registrazione unico (SRN) / Unique registration number (SRN)	Non disponibile / Not available		
UDI-DI di base / Basic UDI-DI	805414149CONTURINANZ		

È conforme secondo il Regolamento (UE) 2017/746 concernente i Dispositivi Medico-Diagnostici in vitro e soddisfa tutti i requisiti specificati. Il dispositivo è stato classificato appartenente alla Classe A secondo la Regola 5 dell' Allegato VIII / It complies with the Regulation (EU) 2017/746 concerning In Vitro Diagnostic Medical Devices and meets all the specified requirements. The device has been classified as belonging to Class A according to Rule 5 of Annex VIII.

Dichiara inoltre che la documentazione tecnica di supporto alla presente dichiarazione di conformità è conservata presso gli uffici dell'azienda e sarà messa a disposizione delle autorità competenti secondo quanto prescritto dall'Art. 10 punto 7 del Regolamento. / It also declares that the technical documentation supporting this declaration of conformity is kept at the company offices and will be made available to the competent authorities in accordance with the provisions of Art. 10 point 7 of the Regulations.

Teolo (PD), 17.12.2022

SYNTESSYS S.R.L.
UNIPERSONALE
Il Legale Rappresentante
Rinaldo Ruggero



ТОВ «ХЕМА» код ЄДРПОУ 36038442
Адреса 03179, м. Київ, вул. Академіка Єфремова, 23
Для кореспонденції: 03179, а/с 49
З питань замовлення продукції: 050-422-62-16, 067-422-62-16
Тел.: +38 (095) 60-99-555 Факс: +38 (044) 422-62-16
e-mail: info@xema.com.ua
www.xema.in.ua

STATEMENT

We, XEMA LLC, as a manufacturer of in vitro diagnostic medical devices, having a registered office at Akademika Yefremova St. 23, Kyiv, Ukraine assign SRL SANMEDICO having a registered office at A. Corobceanu Street 7A, apt. 9, Chişinău MD-2012, Moldova, as authorized representative in correspondence with legislative requirements of the Republic of Moldova.

We declare that the company mentioned above is authorized to register, notify, renew, or modify the registration of medical devices on the territory of the Republic of Moldova.

This Statement shall come into force on the date of its signing. The duration of this Statement is 3 years from the date of signing.

Date: 06.09.2023

Signature:

Director Xema LLC
Oleksandra Zavaliei



СЕРТИФІКАТ

про відповідність системи управління якістю

Зареєстрований у Реєстрі

«29» червня 2022 р.

№ UA.SM.214-21

Дійсний до «03» серпня 2024 р.

Перше видання: «04» серпня 2021 р.

ЦИМ СЕРТИФІКАТОМ ВІДПОВІДНОСТІ ПОСВІДЧУЄТЬСЯ,
ЩО СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКОСТІ СТОСОВНО

**проектування та розроблення, виробництва та дистрибуції
медичних виробів для діагностики in vitro**

впроваджена:

ТОВ «ХЕМА»

за адресою: вул. Академіка Єфремова, 23, м. Київ, 03179, Україна

відповідає вимогам ISO 13485:2016;

ДСТУ EN ISO 13485:2018 (EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT).

Контроль відповідності сертифікованої системи управління якістю вимогам зазначеного стандарту здійснюється шляхом нагляду, періодичність і процедури якого регламентуються процедурами органу з оцінки відповідності.

Сертифікат видано Органом з оцінки відповідності ТОВ «УКРМЕДСЕРТ», акредитованим Національним агентством з акредитації України, атестат від 24.12.2019 № 80047, адреса: вул. Драгоманова, будинок 1-А, оф. 2, м. Київ, 02059, Україна, тел./факс: +38-067-595-02-30, <https://ukrmedcert.org.ua>.

Директор



І.М. Хотенюк



Certificate

Of Marketing Authorization of Medical Product

within Germany, the member states of the European Union
and the other states having a contractual agreement with the European Economic Area

Nr. **AR/IVD/XEMA LLC/01/2023**

Issued on the basis of the Declaration of conformity and registration taking into account Article 11 of Regulation (EU) 2017/746 (IVDR) on In Vitro Diagnostic, and Medical Device Implementing Act (MPDG)

Ausgestellt auf Grund der Konformitätserklärung und Registrierung unter Berücksichtigung der der Verordnung (EU) 2017/746 (IVDR) über In-vitro-Diagnostika und Medizinprodukte-Durchführungsgesetz (MPDG)

Manufacturer / Hersteller

XEMA LLC
UKRAINE, 03179 KYIV
Akademika Yefremova St. 23
qa@xema.com.ua; www.xema.in.ua

SRN: UA-MF-000032959

Product name / Produkt

See annex to the Certificate
Siehe Anhang zum Zertifikat

Product Classification:
Produktklassifizierung

In Vitro Diagnostic Medical Devices
In-vitro-Diagnostikum (IVD) Medizinprodukte

Category:
Kategorie

Common/ Other IVD
Sonstige IVD-Produkte

Conformity assessment procedure:
Konformitätsbewertungsverfahren:

EC DECLARATION OF CONFORMITY
(Annex III, except point 6, Directive 98/79/EC)
in connection with article 110(3) IVDR

EU- KONFORMITÄTserklärung
(Anhang III, außer Nummer 6, Richtlinie 98/79 / EG)
in Verbindung mit Artikel 110 (3) IVDR

State Competent Authority:
Staatliche Zuständige Behörde

BfArM Federal Institute for Drugs and Medical Devices
DMIDS (German Medical Device Information and Database System)

BfArM Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte DMIDS
(Deutsches Medizinprodukte-Informations- und Datenbanksystem)

Date of issue : **2023-03-07**
Das Ausstellungsdatum

Valid to : **2025-05-31**
Gültig bis

Represented in the EC by:

Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fürth, Germany
email: info@polmed.de
Tel: +49 911 93163967



Polmed.de

SRN: DE-AR-000006947

Annex to the Certificate No.:

Anhang zum Zertifikat Nr.:

AR/IVD/XEMA LLC/01/2023

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
1.	ASPERGILLUS	K021	GalMAg EIA	DE/CA64/00115824
2.	HSV IgG	K104	HSV 1/2 IgG EIA	DE/CA64/00115826
3.	HSV IgM	K104M	HSV 1, 2 IgM EIA	DE/CA64/00115833
4.	HSV 2 IgG	K104B	HSV 2 IgG EIA	DE/CA64/00115836
5.	MYCOPLASMA ANTIBODY ASSAYS	K106	Mycoplasma IgG EIA	DE/CA64/00115837
6.	SYPHILIS ANTIBODY ASSAYS TOTAL	K111	anti-Treponema pallidum EIA	DE/CA64/00115839
7.	SYPHILIS ANTIBODY IGG	K111G	Treponema pallidum IgG EIA	DE/CA64/00115840
8.	H. PYLORI ANTIBODY ASSAYS	K119G	Helicobacter pylori IgG EIA	DE/CA64/00115850
9.	OTHER OTHER BACTERIOLOGY IMMUNOASSAY	K126	Ureaplasma IgG EIA	DE/CA64/00115851
10.	THYROID PEROXIDASE (INCL. MICROSOMAL) ANTIBODIES	K131	aTPO EIA	DE/CA64/00115852
11.	THYROGLOBULIN AUTOANTIBODIES	K132	aTG EIA	DE/CA64/00115853
12.	MPO ANCA	K133	aMPO EIA	DE/CA64/00115854
13.	TISSUE TRANSGLUTAMINASE ANTIBODIES	K160 K161	anti-TGlu IgG EIA anti-TGlu IgA EIA	DE/CA64/00115855
14.	GIARDIA LAMBLIA	K171	anti-Giardia lamblia EIA	DE/CA64/00115856
15.	OTHER PARASITOLOGY	K174	Ascaris IgG EIA	DE/CA64/00115857
16.	ECHINOCOCCUS	K175	Echinococcus IgG EIA	DE/CA64/00115858
17.	DISTOMATOSIS	K176	Opisthorchis IgG EIA	DE/CA64/00115859
18.	GLIADIN ANTIBODIES	K180 K181	Gliadin IgG EIA Gliadin IgA EIA	DE/CA64/00115860
19.	IMMUNOGLOBULIN E - TOTAL	K200	Total IgE EIA	DE/CA64/00115861
20.	THYROID STIMULATING HORMONE	K201	TSH EIA	DE/CA64/00115863
21.	LUTEINISING HORMONE	K202	LH EIA	DE/CA64/00115864
22.	FOLLICLE STIMULATING HORMONE	K203	FSH EIA	DE/CA64/00115865
23.	HUMAN GROWTH HORMONE	K204	GH EIA	DE/CA64/00115866
24.	HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN TOTAL	K205	hCG EIA	DE/CA64/00115867
25.	PROLACTIN	K206	Prolactin EIA	DE/CA64/00115868

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

Annex to the Certificate No.:

Anhang zum Zertifikat Nr.:

AR/IVD/XEMA LLC/01/2023

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
26.	PROGESTERONE	K207	Progesterone EIA	DE/CA64/00115869
27.	ESTRADIOL	K208	Estradiol EIA	DE/CA64/00115870
28.	TESTOSTERONE (WITH DEHYDRO AND FREE TESTOSTERONE)	K209	Testosterone EIA	DE/CA64/00115871
29.	CORTISOL	K210	Cortisol EIA	DE/CA64/00115872
30.	TRIIODOTHYRONINE	K211	T3 EIA	DE/CA64/00115873
31.	THYROXINE	K212	T4 EIA	DE/CA64/00115874
32.	FREE TRIIODOTHYRONINE	K213	ft3 EIA	DE/CA64/00115875
33.	FREE THYROXINE	K214	ft4 EIA	DE/CA64/00115876
34.	DEHYDRO-EPIANDROSTERONE SULPHATE (INCL. DHEA)	K215	DHEAS EIA	DE/CA64/00115877
35.	17 OH PROGESTERONE	K217	17-OH-progesterone EIA	DE/CA64/00115878
36.	ESTRIOL	K218	free Estriol EIA	DE/CA64/00115880
37.	TESTOSTERONE (WITH DEHYDRO AND FREE TESTOSTERONE)	K219	free Testosterone EIA	DE/CA64/00115881
38.	CANCER ANTIGEN 125	K222	CA 125 EIA	DE/CA64/00115882
39.	CANCER ANTIGEN 19-9	K223	CA 19-9 EIA	DE/CA64/00115883
40.	CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN	K224	CEA EIA	DE/CA64/00115884
41.	ALPHAFETOPROTEIN	K225	AFP EIA	DE/CA64/00115885
42.	CANCER ANTIGEN 15-3	K226	CA 15-3 (M12) EIA	DE/CA64/00115886
43.	OTHER OTHER TUMOUR MARKERS	K232	Thyroglobulin EIA	DE/CA64/00115887
44.	β HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN (INCL. SUBUNIT)	K235	free β-HCG EIA	DE/CA64/00115888
45.	CYFRA 21-1	K236	CYFRA 21-1 EIA	DE/CA64/00115889
46.	SQUAMOUS CELL CARCINOMA ANTIGEN	K237	SCC (A) EIA	DE/CA64/00115890
47.	PREGNANCY ASSOCIATED PLASMA PROTEIN - A (DOWNS)	K238	PAPP-A EIA	DE/CA64/00115892
48.	OTHER OTHER TUMOUR MARKERS	K239	HE4 EIA	DE/CA64/00115893
49.	CANCER ANTIGEN 242	K243	CA242 EIA	DE/CA64/00115894
50.	OTHER PREGNANCY TESTING HORMONES	K245	AMH EIA	DE/CA64/00115896

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

Annex to the Certificate No.:

Anhang zum Zertifikat Nr.:

AR/IVD/XEMA LLC/01/2023

The following medical devices can be placed on the market in the Federal Republic of Germany, in the member states of the European Economic Community (EEC) and in the other contract states of the agreement about the European Economic Area.

Die folgenden Medizinprodukte in der Bundesrepublik Deutschland, in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Wirtschaftsgemeinschaft (EG) und in den Vertragsstaaten der EG in den Verkehr gebracht werden dürfen.

#	Nomenclature term Nomenklaturbezeichnung	Catalog No. Katalog-Nr.	Name of device Produktbezeichnung	DMIDS Registration number Registriernummer
51.	HUMAN PLACENTAL LACTOGEN HPL	K246	Placental lactogen EIA	DE/CA64/00115897
52.	C-REACTIVE PROTEIN	K250	CRP EIA	DE/CA64/00115898
53.	C-PEPTIDE	K267C	C-peptide EIA	DE/CA64/00115900
54.	INSULIN	K267N	Insulin EIA	DE/CA64/00115901
55.	SEX HORMONE BINDING GLOBULIN	K268	SHBG EIA	DE/CA64/00115902
56.	TROPONIN (T + I)	K291	Troponin I EIA	DE/CA64/00115903
57.	LYME ANTIBODY IGG	K118G	Borelia burgdorferi IgG EIA	DE/CA64/00115904
58.	LYME ANTIBODY IGM	K118M	Borelia burgdorferi IgM EIA	DE/CA64/00115905
59.	EBV ANTIBODIES	K108V K108VM K108N	Epstein-Barr virus VCA IgG EIA Epstein-Barr virus VCA IgM EIA Epstein-Barr virus EBNA IgG EIA	DE/CA64/00115906

The above-mentioned medical products are marked with the CE symbol.
Die oben genannten medizinischen Produkte sind mit dem CE-Zeichen gekennzeichnet.

Represented in the EC by:

Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fürth, Germany
email: info@polmed.de
Tel: +49 911 93163967

SRN: **DE-AR-000006947**Date: **March 07, 2023**

Polmed.de



Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
thyroid stimulating hormone
in human serum or plasma

TSH EIA

Catalogue number **REF** **K201**



For 96 determinations



In vitro diagnostic medical device

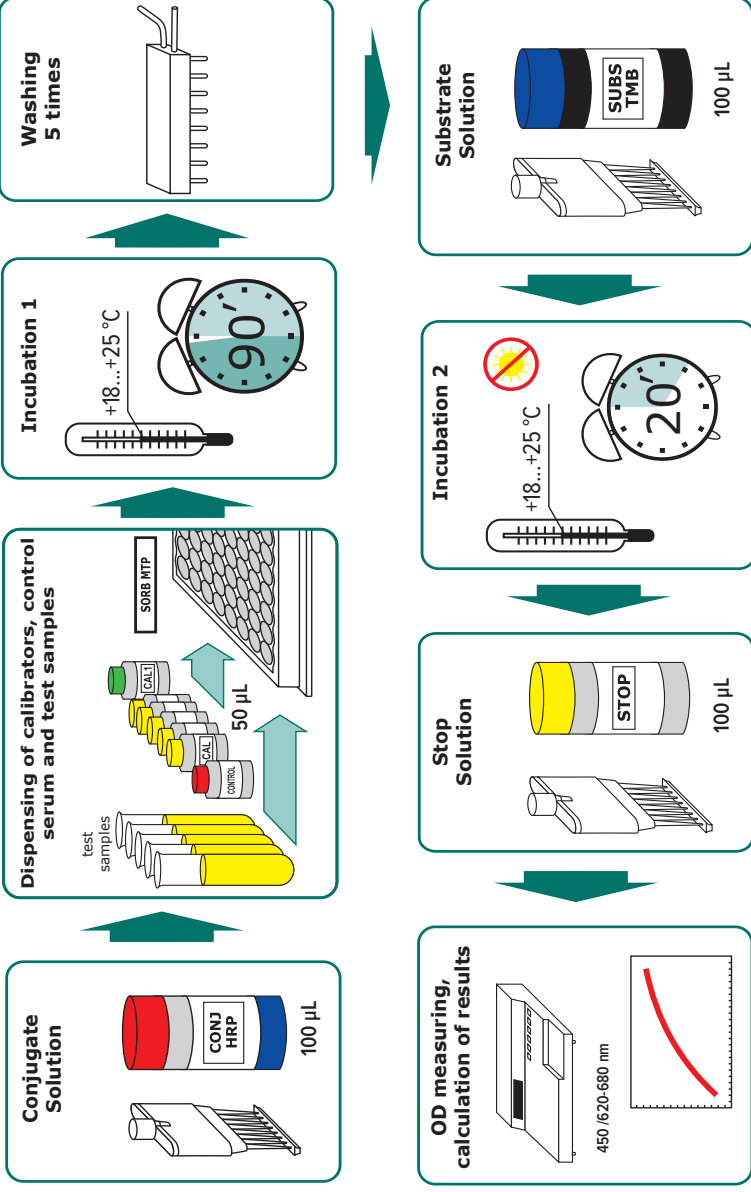


XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.in.ua



Authorized Representative in EU:
Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fuerth, Germany
tel.:+ 49 911 931 639 67
E-mail: info@polmed.de
www.polmed.de

ASSAY PROCEDURE



CONTENT

1. INTENDED USE	2
2. GENERAL INFORMATION	2
3. TEST PRINCIPLE	3
4. KIT COMPONENTS	4
5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
6. WARNING AND PRECAUTIONS	5
7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES	6
8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL	6
9. REAGENTS PREPARATION	7
10. ASSAY PROCEDURE	7
11. TEST VALIDITY	9
12. EXPECTED VALUES	9
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	9
14. REFERENCES	11
SAMPLES IDENTIFICATION PLAN	12

Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
thyroid stimulating hormone
in human serum or plasma
TSH EIA

1. INTENDED USE

The TSH EIA kit is an enzyme immunoassay, intended for the quantitative determination of thyroid stimulating hormone in human serum or plasma.

The field of application is clinical laboratory diagnostics.

2. GENERAL INFORMATION

Thyroid stimulating hormone (TSH) is a glycoprotein with molecular weight ca.30 kDa which is secreted by hypophysis. A molecule of TSH consists of two noncovalently bound subunits: α and β . β -subunit determines biological activity and immunological specificity of TSH.

TSH stimulates thyroid gland to secrete thyroid hormones. When the concentration of these hormones in blood serum increases secretion of TSH is inhibited; on the contrary, when the level of thyroid hormones decreases, in the pituitary gland, the release of TSH increases, and therefore the production and release increases thyroid hormones. TSH secretion is subject to circadian rhythms with highest levels seen early in the morning (6 a.m.). Changes of TSH blood level during a day are not significant; nevertheless, if the results do not correspond with clinical status and other laboratory data, it is recommended to take and test another blood sample.

Determination of TSH level in serum is recommended in the following states and conditions:

- 1) diagnostics of dysfunction of the thyroid gland;
- 2) hypothyroidism (TSH level is increased. The diagnosis is confirmed by low concentrations of total and free T4 and T3. In mild subclinical forms when T4 and T3 levels are within normal ranges, determination of TSH concentration is critical);
- 3) hyperthyroidism (synthesis and secretion of TSH are inhibited); monitoring of replacement therapy;
- 4) screening for congenital hypothyroidism (on the fifth day of life, the level is determined TSH in a blood spot on filter paper or in blood serum). TSH level elevated at birth (up to 35 mIU/L), but after a few days it decreases to basal (both in boys and in girls).

Serum TSH level is elevated during pregnancy, after physical stress, in individuals with lowered blood pressure and lowered temperature. Secretion of TSH is inhibited by Cortisol and Growth hormone. Low TSH levels are often seen in elderly people, in patients with chronic renal insufficiency, liver cirrhosis, in retardation of sexual development, in secondary amenorrhea, Cushing syndrome, acromegaly.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The determination of TSH is based on the two-site sandwich enzyme immunoassay principle. On the inner surface of the microplate wells are immobilized specific murine monoclonal antibodies to β -chain of human TSH. Second antibodies – Fab 2 fragment of murine monoclonal antibodies to human TSH conjugated to the horseradish peroxidase is used as enzyme conjugate.

The analysis procedure includes two stages of incubation:

- during the first stage TSH from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface, as well as horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibodies bind to free epitopes of immobilized TSH;

- during the second stage, the complexes formed due to the reaction with the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine are visualized.

After stopping the reaction with a stop solution, the intensity of the color of the microwells is measured. The optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured TSH in the serum specimen (plasma). The concentration is determined according to the calibration graph of the dependence of the optical density on the content of TSH in the calibration samples.

4. KIT COMPONENTS

Code of component	Symbol	Name	Volume	Qty, pcs.	Description
P201Z	SORB MTP	Microplate	-	1	96-well polystyrene strip microplate coated with murine monoclonal antibodies to β -chain of human TSH; ready to use
C201Z	CAL 1	Calibrator C1	2 mL	1	Solution based on phosphate buffer (pH 7.2-7.4), free of human TSH, with preservative, ready to use (yellow liquid)
C201Z	CAL 2-6	Calibrators	0.8 mL	5	Solution based on phosphate buffer (pH 7.2-7.4), containing 0,2; 1; 5; 10 and 20 mIU/L of human TSH, with preservative, ready to use (red liquids)
Q201Z	CONTROL	Control Serum	0.8 mL	1	Solution based on human serum, containing of known human TSH content, with preservative, ready to use (colourless liquid)
T201Z	CONJ HRP	Conjugate Solution	14 mL	1	Solution of Fab 2 fragment of murine monoclonal antibodies to human TSH conjugated to the horseradish peroxidase; ready to use (blue liquid)
R055Z	SUBS TMB	Substrate Solution	14 mL	1	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution; ready to use (colourless liquid)
S008Z	BUF WASH 26X	26x Concentrate Washing Solution	22 mL	1	Buffer solution with detergent, 26x concentrate (colourless liquid)
R050Z	STOP	Stop Solution	14 mL	1	5.0% solution of sulphuric acid; ready to use (colourless liquid)

The kit also includes instruction for use, quality control data sheet and plate sealing tape (2 pcs.)

5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- microplate photometer with 450 nm wavelength or 450\620-680 nm;
- automatic plate washer (optional);
- micropipettes with variable volume, range volume 5-1000 µL;
- graduated cylinder of 1000 mL capacity;
- distilled or deionized water;
- timer;
- vortex mixer;
- disposable gloves;
- absorbent paper.

6. WARNING AND PRECAUTIONS

In order to prevent incorrect results, strictly follow the recommended order and duration of the analysis procedure.

6.1. The kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional laboratory use.

6.2. Follow the rules mentioned below during the kit using:

- do not use kit beyond expire date;
- do not use the kit if its packaging is damaged;
- in order to avoid contamination, use new tips to pipette samples and reagents;
- use only verified equipment;
- close each vial with its own cap, after using the reagent;
- do not use components of other kits or reagents of other manufacturers;
- do not let wells dry after completing the rinsing step; immediately proceed to the next stage;
- avoid bubbles when adding reagents.

ATTENTION! The TMB substrate solution is light sensitive. Avoid prolonged exposure of the component to light.

6.3. Some kit components, such as stop solution, substrate solution, and washing solution, may cause toxic or irritant effects. If they get on the skin or mucosa, the affected area should be washed with plenty of running water.

6.4. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

6.5. The Calibrators and Control Serum included in the kit are negative for antibodies to HIV 1,2, hepatitis C virus and HBsAg, but the reagents should be considered as potentially infectious material and handled carefully.

6.6. Specimens must not contain any azide compounds, as they inhibit activity of peroxidase.

6.7. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.

6.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

6.9. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA LLC.

6.10. Serious incidents related to the kit must be reported to the manufacturer, Authorized Representative, and to the Competent Authority of the EU member state(s) where the incident has occurred.

7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES

7.1. Blood sampling should be carried out from the cubital vein with a disposable needle using a vacuum blood sampling system. Serum or plasma specimens should be clearly labeled and identified. Serum must be separated from the clot as early as possible to avoid hemolysis of red blood cells. If there are any visible particles in the sample, they should be removed by centrifugation at 3000-5000 rpm for 20 minutes at room temperature or by filtration.

Don't use samples with high lipidemia, hemolysis as they may give false test results.

7.2. Specimen should be stored at +2...+8°C up to 3 days. Specimen held for a longer time, should be placed in a freezer at -15°C or below, do not refreeze/thaw samples.

7.3. For the transportation of samples, it is recommended to use triple packaging. The primary package is the labeled tube containing the sample. Secondary packaging is a polyethylene bag that is hermetically closed with a zip-lock. The outer packaging is a heat-insulating container, while the secondary packaging is placed in the outer packaging for transportation in the center of the thermal container. Frozen refrigerants are placed on the bottom, along the side walls of the thermal container, and cover the samples with them.

8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL

Information about the singularity storage conditions, transportation of the kit, and disposal of waste should be taken into account by all persons who participate in these processes.

8.1. Transportation

The TSH EIA kit should be transported in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Single transportation at the temperature up to 25°C for 5 days is acceptable.

8.2. Storage

The TSH EIA kit should be stored in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Do not freeze.

The kit contains reagents sufficient for 96 determinations including Calibrators and Control Serum.

Once opened test-kit is stable for 2 months when stored properly as intended by manufacturer at 2-8°C.

In case of partial use of the kit, the components should be stored in the following way:

- strips that remain unused must be carefully sealed with the plate sealing tape and stored at +2...+8°C within 2 months;
- Substrate Solution, Stop Solution, and Washing Solution concentrate after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C until the kit's shelf life;
- Conjugate Solution, Calibrators and Control Serum after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C within 2 months.

NOTE: Single freezing of Calibrators and Control Serum in aliquots is allowed.

- diluted Washing Solution can be stored at room temperature (+18...+25°C) for up to 5 days or at +2...+8°C for up to 14 days.

Kits that were stored in violation of the storage condition cannot be used.

8.3. Disposal

Expired kit components, used reagents and materials, as well as residual samples must be inactivated and disposed of in accordance with legal requirements.

9. REAGENTS PREPARATION

9.1. All reagents (including microstrips) and test samples should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before use.

9.2. Microplate preparation

Open the package with the microplate and install the required number of strips into the frame. Unused strips must be sealed with plate sealing tape to prevent moisture from affecting the plate's holes and placed back in the bag.

9.3. Washing Solution preparation

Add the contents of the 22 mL Washing Solution concentrate vial to 550 mL of distilled or deionized water and mix thoroughly. In case of partial use of the kit, take the necessary amount of Washing Solution concentrate and dilute it 26 times with distilled or deionized water.

The spending of the components in case of partial use of the kit is given in the table:

Quantity of strips	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume of the Washing Solution concentrate, mL	1.8	3.6	5.4	7.2	9	10.8	12.6	14.4	16.2	18	19.8	22
Volume of water, mL	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450	495	550

9.4. Samples preparation

If suggested analyte concentration in the sample exceeds the 20 mIU/L, additionally dilute this sample accordingly, using (Calibrator C1). Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.

NOTE: in order to obtain reliable results, we recommend to use several successive dilutions of the blood serum (plasma) sample

Do not dilute Control Serum and Calibrators!

10. ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

- 10.1 Put the desired number of strips into the frame based on the number of test samples in 2 replicates and 14 wells for Calibrators and Control Serum (2 wells for each Calibrator (CAL 1-6) and 2 wells for Control Serum (Q)).
- 10.2 If necessary, dilute the test samples as described in 9.4.
- 10.3 Dispense **100 µL of Conjugate Solution** to all wells.
- 10.4 Dispense **50 µL of Calibrators and Control Serum as well as 50 µL of test serum/plasma samples (SAMP)** to the wells of the microplate according to the scheme below. The introduction of Calibrators, Control Serum and test samples should be carried out within 5 minutes to ensure equal incubation time for the first and last samples.

NOTE: during performing several independent series of tests, Calibrators, and Control Serum should be used each time.

Scheme of introduction of samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL1	SAMP2	SAMP2	SAMP10	SAMP10						
B	CAL2	CAL2	SAMP3	SAMP3	SAMP11	SAMP11						
C	CAL3	CAL3	SAMP4	SAMP4	SAMP12	SAMP12						
D	CAL4	CAL4	SAMP5	SAMP5								
E	CAL5	CAL5	SAMP6	SAMP6								
F	CAL6	CAL6	SAMP7	SAMP7								
G	Q	Q	SAMP8	SAMP8								
H	SAMP1	SAMP1	SAMP9	SAMP9								

- 10.5 Carefully mix the contents of the microplate in a circular motion on a horizontal surface, cover strips with a plate sealing tape and incubate for **90 minutes at room temperature (+18...+25°C)**.
- 10.6 At the end of the incubation period, remove and discard the plate cover. Aspirate and wash each well 5 times using an automatic washer or an 8-channel dispenser. For each washing, add 300 μL of Washing Solution (see 9.3) to all wells, then remove the liquid by aspiration or decantation. The residual volume of the Washing Solution after each aspiration or decantation should be no more than 5 μL . After washing, carefully remove the remaining liquid from the wells on the absorbent paper. For the automatic washer/analyzer, the wash solution volume can be increased to 350 μL .
- 10.7 Add **100 μL of Substrate Solution** to all wells. The introduction of the Substrate Solution into the wells must be carried out within 2-3 minutes. Incubate the microplate in the dark **at room temperature (+18...+25°C) for 20 minutes**.
- 10.8 Add **100 μL of Stop Solution** to all wells in the same order as the Substrate Solution. After adding the Stop Solution, the contents of the wells turn yellow.
- 10.9 Read the optical density (OD) of the wells at 450nm and reference light filters 620–680 nm using a microplate photometer within 5 minutes of adding the Stop Solution. Set photometer blank on CAL1.
- 10.10 Plot a calibration curve in linear coordinates: (x) is the TSH concentration in the calibrators mIU/L, (y) – OD versus TSH concentration (OD 450 nm / 620–680 nm). Manual or computerized data reduction is applicable at this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.
- 10.11 Determine the corresponding concentration of TSH in tested samples from the calibration curve. In the case of preliminary dilution of the test sample (see 9.4), the obtained result should be multiplied by the dilution factor.

11. TEST VALIDITY

The test run shall be considered valid if the OD of CAL1 is above 0.15, and the values of the Control Serum fall into the required range (see Quality control Data Sheet).

12. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on the results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for TSH. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below).

NOTE: values of TSH concentrations in the tested samples that are below the LoD (0.04 mIU/L) and also exceed the value of the upper Calibrator (20 mIU/L) should be provided in the following form : «the TSH concentration of tested sample X is «lower than 0.04 mIU/L» or «higher than 20 mIU/L».

Sex, age	Units, mIU/L	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	0.3	4.0

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1. Analytical performance characteristics

13.1.1 Precision of Measurement

Repeatability (Intra assay repeatability) was determined by evaluation the coefficient of variation (CV) for 2 different samples during 1 day in 24 replicates on one series of ELISA kit.

Sample	Concentration, mIU/L	CV, %
1	2.12	7.2
2	3.64	3.8

Reproducibility (Inter assay reproducibility) was determined by evaluating the coefficients of variation for 2 samples during 5 days in 8-replicate determinations.

Sample	Concentration, mIU/L	CV, %
1	2.27	12.0
2	3.87	6.4

Reproducibility between lots was investigated by testing samples for one day on three lots. Each sample was run in 8 replicates.

Sample	Concentration1, mIU/L	Concentration2, mIU/L	Concentration3, mIU/L	CV, %
1	2.32	2.02	1.81	9.9
2	3.71	3.56	3.32	5.6

13.1.2 Trueness

The trueness of measurement is the degree of closeness of the average value obtained from a large number of measurement results to the true value. The bias of the measurement result (bias of measurements) is the difference between the mathematical expectation of the measurement result and the true value of the measurand. The bias was calculated for each sample and it was determined that it corresponds to the specified limits of $\pm 10\%$.

13.1.3 Linearity

Linearity was determined using sera samples with known TSH concentration (low and high) and mixing them with each other and buffer solution in different proportions. According to the measurements, linear range of kit is 0.2-10 mIU/L \pm 10%.

13.1.4 Analytical sensitivity

Limit of detection (LoD) – the lowest TSH concentration in the serum or plasma sample that is detected by the TSH EIA kit is no lower than 0.04 mIU/L.

Limit of quantification (LoQ) – the lowest concentration of the analyte in the sample that is determined quantitatively with the declared trueness for TSH EIA kit is 0,15 mIU/L.

13.1.5 Hook Effect

Hook effect is absent for all samples up to reasonably foreseen concentrations 20 mIU/L.

13.1.5 Analytical specificity

For the analysis result is not affected by the presence in the sample of bilirubin in a concentration of up to 0.21 mg/mL and hemoglobin in a concentration of up to 10 mg/mL.

The cross-reactivity of TSH with other analytes is shown in the table:

Analyte	Cross-reactivity, %
HCG	< 0.1
LH	< 0.1
FSH	< 0.1

14. REFERENCES

1. Ekins R. Methods for measurement of free thyroid hormones. In: Free thyroid hormones. Amsterdam: Expecta Medica; 1979; p. 72-92.
2. Tietz, N., Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia: 791 and 844 (1976).
3. Soos, M., Taylor, S.J., Gard, T., and Siddle, K.A. Rapid Sensitive Two-Site Immunometric Assay for TSH Using Monoclonal Antibodies: Investigation of Factors Affecting Optimisation. J. of Immunological Methods 73, 237-249 (1984).
4. Lundberg, P. A., Jagenburg, R., Lindstedt, G., Nystrom, E., Clin. Chem. 1982, 28:1241.
5. Musto, J.D., Pizzolante, J.M., Chesarone, V.P. A Comment of Thyrotropin Measurement and Evaluation. Clin. Chem. 30, 329-330 (1984). Opinion.
6. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поводження з медичними відходами».
7. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
8. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСР (НАОП 9.1.50-1.09-81)

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN













	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

	Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
 YYYY-MM	Use-by date
	Batch code
	Temperature limit
	Contains sufficient for <n> tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Conformity Marking with technical regulations in Ukraine
	Authorized representative in the European Community/European Union
	CE Conformity Marking

**For any issues related to operation of the kit and technical support,
please contact by telefon number**

+38 044 294-69-78

or write to:

qa@xema.com.ua



XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.in.ua



Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
free thyroxin in human serum or plasma

fT4 EIA

Catalogue number **REF** **K214**



For 96 determinations



In vitro diagnostic medical device



XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.in.ua



Authorized Representative in EU:
Polmed.de Beata Rozwadowska
Fichtenstr. 12A, 90763 Fuerth, Germany
tel.:+ 49 911 931 639 67
E-mail: info@polmed.de
www.polmed.de

ASSAY PROCEDURE

Dispensing of Calibrators, Control Serum and test samples

test samples
CAL
CONTROL
SORB MTP
25 µl

Conjugate Solution

CONJ HRP
100 µl

Incubation 1

+37 °C
60'

Washing 5 times

Washing 5 times

OD measuring, calculation of results

450 nm

Stop Solution

STOP
100 µl

Incubation 2

+18-25 °C
15'

Substrate Solution

SUBS TMB
100 µl

CONTENT

1. INTENDED USE	2
2. GENERAL INFORMATION	2
3. TEST PRINCIPLE	2
4. KIT COMPONENTS	3
5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED	4
6. WARNING AND PRECAUTIONS	4
7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES	5
8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL	5
9. REAGENTS PREPARATION	6
10. ASSAY PROCEDURE	6
11. TEST VALIDITY	7
12. EXPECTED VALUES	7
13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
14. REFERENCES	9
SAMPLES IDENTIFICATION PLAN	10

Instruction for use
A solid-phase enzyme immunoassay kit
for the quantitative determination of
free thyroxin in human serum or plasma
fT4 EIA

1. INTENDED USE

The fT4 EIA kit is an enzyme immunoassay, intended for the quantitative determination of free thyroxin in human serum or plasma.

The field of application is clinical laboratory diagnostics.

2. GENERAL INFORMATION

Thyroid hormones thyroxin (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3) exert regulatory influences on growth, differentiation, cellular metabolism and development of skeletal and organ systems. T4 and T3 in blood are found both in free and bound form – mostly, they are bound to thyroxin binding globulin (TBG). Only free forms of T3 and T4 exert hormonal activity also their percentage is very low – 0.3% for T3 and 0.03% for T4.

The concentration of T4 is generally accepted as an index of thyroid function which provide enough information to differentiate between hyper-, hypo- and euthyroidism.

Elevation of total T4 is found in hyperthyroidism, in patients with tumours of pituitary gland, in subjects with elevated TBG level (pregnancy, acute or chronic active hepatitis, estrogen-secreting tumours or estrogen intake, hereditary elevation of TBG), in patients taking oral contraceptives, heroin, methadone, thyroid preparations, TSH, thyroliberin.

Low total T4 is found in hypothyroidism, in patients with panhypopituitarism, in subjects with low TBG level (acromegaly, nephritic syndrome, hypoproteinemia, chronic liver diseases, androgen-secreting tumours, hereditary reduction), in patients taking aminosalicilic and acetylsalicilic acids, cholestyramine, reserpine, potassium iodide, triiodothyronine.

3. TEST PRINCIPLE

Determination of free thyroxin is based on competition principle of the enzyme immunoassay. Microwells plate is coated with specific murine monoclonal antibodies to T4. fT4 conjugated to the horseradish peroxidase is used as enzyme conjugate. The analysis procedure includes two stages of incubation:

- during the first stage fT4 from the specimen competes with the conjugated fT4 for coating antibodies. As a result, a complex bounded to the solid phase and containing peroxidase is formed.

- during the second stage, the complexes formed due the reaction with the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine are visualized.

After stopping the reaction with a stop solution, the intensity of the color of the microwells is measured. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured fT4 in the specimen of the serum (plasma).

The concentration is determined according to the calibration graph of the dependence of the optical density on the content of fT4 in the calibration samples.

4. KIT COMPONENTS

Code of component	Symbol	Name	Volume	Qty, pcs.	Description
P214Z	SORB MTP	Microplate	-	1	96-well polystyrene strip microplate coated with murine monoclonal antibodies to T4; ready to use
C214Z	CAL 1	Calibrator C1	0.5 mL	1	Solution based on human plasma, free of FT4, with preservative, ready to use (yellow liquid)
C214Z	CAL 2-6	Calibrators	0.5 ml	5	Solutions based on human plasma, containing 5; 10; 25, 50 and 100 pmol/L of FT4, with preservative, ready to use (red liquids)
Q214Z	CONTROL	Control Serum	0.5 ml	1	Solution based on human plasma, containing of known FT4 content, with preservative, ready to use (colourless liquid)
T214Z	CONJ HRP	Conjugate Solution	12 ml	1	Solution of FT4 conjugated to the horseradish peroxidase; ready to use (red liquid)
R055Z	SUBS TMB	Substrate Solution	12 ml	1	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution; ready to use (colourless liquid)
S008Z	BUF WASH 26X	26x Concentrate Washing Solution	22 ml	1	Buffer solution with detergent, 26x concentrate (colourless liquid)
R050Z	STOP	Stop Solution	12 ml	1	5.0% solution of sulphuric acid; ready to use (colourless liquid)
The kit also includes instruction for use, quality control data sheet and plate sealing tape (1 pcs.)					

5. EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- microplate photometer with 450 nm wavelength;
- dry thermostat for $+37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- automatic plate washer (optional);
- micropipettes with variable volume, range volume 5-1000 μL ;
- graduated cylinder of 1000 mL capacity;
- distilled or deionized water;
- timer;
- vortex mixer;
- disposable gloves;
- absorbent paper.

6. WARNING AND PRECAUTIONS

In order to prevent incorrect results, strictly follow the recommended order and duration of the analysis procedure.

6.1. The kit is for *in vitro* diagnostic use only. For professional laboratory use.

6.2. Follow the rules mentioned below during the kit using:

- do not use kit beyond expire date;
- do not use the kit if its packaging is damaged;
- in order to avoid contamination, use new tips to pipette samples and reagents;
- use only verified equipment;
- close each vial with its own cap, after using the reagent;
- do not use components of other kits or reagents of other manufacturers;
- do not let wells dry after completing the rinsing step; immediately proceed to the next stage;
- avoid bubbles when adding reagents.

ATTENTION! The TMB substrate solution is light sensitive. Avoid prolonged exposure of the component to light.

6.3. Some kit components, such as stop solution, substrate solution, and washing solution, may cause toxic or irritant effects. If they get on the skin or mucosa, the affected area should be washed with plenty of running water.

6.4. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

6.5. The Calibrators and Control Serum included in the kit are negative for antibodies to HIV 1,2, hepatitis C virus and HBsAg, but the reagents should be considered as potentially infectious material and handled carefully.

6.6. Specimens must not contain any azide compounds, as they inhibit activity of peroxidase.

6.7. Wear protective gloves, protective clothing, eye protection, face protection.

6.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

6.9. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA LLC.

6.10. Serious incidents related to the kit must be reported to the manufacturer, Authorized Representative, and to the Competent Authority of the EU member state(s) where the incident has occurred.

7. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE OF SAMPLES

7.1. Blood sampling should be carried out from the cubital vein with a disposable needle using a vacuum blood sampling system. Serum or plasma specimens should be clearly labeled and identified. Serum must be separated from the clot as early as possible to avoid hemolysis of red blood cells. If there are any visible particles in the sample, they should be removed by centrifugation at 3000-5000 rpm for 20 minutes at room temperature or by filtration.

Don't use samples with high lipidemia, hemolysis as they may give false test results.

7.2. Specimen should be stored at +2...+8°C up to 3 days. Specimen held for a longer time, should be placed in a freezer at -15°C or below; do not refreeze/thaw samples.

7.3. For the transportation of samples, it is recommended to use triple packaging. The primary package is the labeled tube containing the sample. Secondary packaging is a polyethylene bag that is hermetically closed with a zip-lock. The outer packaging is a heat-insulating container, while the secondary packaging is placed in the outer packaging for transportation in the center of the thermal container. Frozen refrigerants are placed on the bottom, along the side walls of the thermal container, and cover the samples with them.

8. TRANSPORTATION AND STORAGE TERMS OF KIT, WASTE DISPOSAL

Information about the singularity storage conditions, transportation of the kit, and disposal of waste should be taken into account by all persons who participate in these processes.

8.1. Transportation

The ft4 EIA kit should be transported in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Single transportation at the temperature up to 25°C for 5 days is acceptable.

8.2. Storage

The ft4 EIA kit should be stored in the manufacturer's packaging at +2...+8°C. Do not freeze.

The kit contains reagents sufficient for 96 determinations including Calibrators and Control Serum.

Once opened test-kit is stable for 2 months when stored properly as intended by manufacturer at 2-8°C.

In case of partial use of the kit, the components should be stored in the following way:

- the remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel, closed with the zip-lock, and stored at +2...+8°C within 2 months
- Substrate Solution, Stop Solution, and Washing Solution concentrate after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C until the kit's shelf life;
- Conjugate Solution, Calibrators and Control Serum after opening the vial, can be stored tightly closed at +2...+8°C within 2 months;
- *NOTE: Single freezing of Calibrators and Control Serum in aliquots is allowed.*
- diluted washing solution can be stored at room temperature (+18...+25°C) for up to 5 days or at +2...+8°C for up to 14 days.

Kits that were stored in violation of the storage condition cannot be used.

8.3. Disposal

Expired kit components, used reagents and materials, as well as residual samples must be inactivated and disposed of in accordance with legal requirements.

9. REAGENTS PREPARATION

9.1. All reagents (including microstrips) and test samples should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before use.

9.2. Microplate preparation

Open the package with the microplate and install the required number of strips into the frame. The remaining strips should be immediately resealed in the bag along with the silica gel and closed with the zip-lock to prevent moisture from affecting the plate's strips.

9.3. Washing Solution preparation

Add the contents of the 22 mL Washing Solution concentrate vial to 550 mL of distilled or deionized water and mix thoroughly. In case of partial use of the kit, take the necessary amount of washing solution concentrate and dilute it 26 times with distilled or deionized water.

The spending of the components in case of partial use of the kit is given in the table:

Quantity of strips	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volume of the Washing Solution concentrate, mL	1.8	3.6	5.4	7.2	9	10.8	12.6	14.4	16.2	18	19.8	22
Volume of water, mL	45	90	135	180	225	270	315	360	405	450	495	550

10. ASSAY PROCEDURE

- 10.1 Put the desired number of strips into the frame based on the number of test samples in 2 replicates and 14 wells for Calibrators and Control Serum (2 wells for each calibrator (CAL 1-6) and 2 wells for control serum (Q)).
- 10.2 Dispense **25 µL of Calibrators and Control Serum as well as 25 µL of test serum/plasma samples (SAMP)** to the wells of the microplate according to the scheme below. The introduction of Calibrators, Control Serum and test samples should be carried out within 5 minutes to ensure equal incubation time for the first and last samples.

Note: during performing several independent series of tests, Calibrators, and Control Sample should be used each time.

Scheme of introduction of samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CAL1	CAL1	SAMP2	SAMP2	SAMP10	SAMP10						
B	CAL2	CAL2	SAMP3	SAMP3	SAMP11	SAMP11						
C	CAL3	CAL3	SAMP4	SAMP4	SAMP12	SAMP12						
D	CAL4	CAL4	SAMP5	SAMP5								
E	CAL5	CAL5	SAMP6	SAMP6								
F	CAL6	CAL6	SAMP7	SAMP7								
G	Q	Q	SAMP8	SAMP8								
H	SAMP1	SAMP1	SAMP9	SAMP9								

- 10.3 Add **100 µL of the Conjugate Solution** to all wells.
- 10.4 Carefully mix the contents of the microplate in a circular motion on a horizontal surface, cover strips with a plate sealing tape and incubate for **60 minutes at +37°C**.
- 10.5 At the end of the incubation period, remove and discard the plate cover. Aspirate and wash each well 5 times using an automatic washer or an 8-channel dispenser. For each washing, add 300 µL of Washing Solution (see 9.3) to all wells, then remove the liquid by aspiration or decantation. The residual volume of the Washing Solution after each aspiration or decantation should be no more than 5µL. After washing, carefully remove the remaining liquid from the wells on the absorbent paper. For the automatic washer/analyzer, the Washing Solution volume can be increased to 350 µL
- 10.6 Add **100 µL of Substrate Solution** to all wells. The introduction of the substrate solution into the wells must be carried out within 2-3 minutes. Incubate the microplate in the dark **at room temperature (+18...+25°C) for 15 minutes**.
- 10.7 Add **100 µL of Stop Solution** to all wells in the same order as the substrate solution. After adding the Stop Solution, the contents of the wells turn yellow.
- 10.8 Read the optical density (OD) of the wells at 450nm using a microplate photometer within 5 minutes of adding the Stop Solution.
- 10.9 Plot a calibration curve in semi-logarithmic coordinates: (x) is the decimal logarithm of the fT4 concentration in the calibrators pmol/L, (y) – OD versus fT4 concentration (OD 450 nm). Manual or computerized data reduction is applicable at this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve. Adjust the concentration of CAL1 to an infinitesimally small value, for example, 0.001 pmol/L.
- 10.10 Determine the corresponding concentration of fT4 in tested samples from the calibration curve.

11. TEST VALIDITY

The test run shall be considered valid if the OD of CAL1 is above 1.2, and the values of the Control Serum fall into the required range (see Quality control Data Sheet).

12. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for fT4. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

NOTE: values of fT4 concentrations in the tested samples that are below the LoD (0.75 pmol/L) and also exceed the value of the upper calibrator (100 pmol/L) should be provided in the following form : «the fT4 concentration of tested sample X is «lower than 0.75 pmol/L» or «higher than 100 pmol/L».

Sex, age	Units, pmol/L	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors		
< 60 yrs	10	25
> 60 yrs	10	21
Pregnancy week		
1st trimester	9	26
2nd trimester	6	21
3rd trimester	6	21

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1. Analytical performance characteristics

13.1.1 Precision of Measurement

Repeatability (Intra assay repeatability) was determined by evaluation the coefficient of variation (CV) for 2 different samples during 1 day in 24 replicates on one series of ELISA kit.

Sample	Concentration, pmol/L	CV, %
1	54.4	5.83
2	85.23	3.67

Reproducibility (Inter assay reproducibility) was determined by evaluating the coefficients of variation for 2 samples during 5 days in 8-replicate determinations.

Sample	Concentration, pmol/L	CV, %
1	54.36	1.15
2	85.73	3.23

Reproducibility between lots was investigated by testing samples for one day on three lots. Each sample was run in 8 replicates.

Sample	Concentration1, pmol/L	Concentration2, pmol/L	Concentration3, pmol/L	CV, %
1	54.59	52.67	60.39	7.19
2	85.23	87.53	85.13	1.58

13.1.2 Trueness

The trueness of measurement is the degree of closeness of the average value obtained from a large number of measurement results to the true value. The bias of the measurement result (bias of measurements) is the difference between the mathematical expectation of the measurement result and the true value of the measurand. The bias was calculated for each sample and it was determined that it corresponds to the specified limits of $\pm 10\%$.

13.1.3 Linearity

Linearity was determined using sera samples with known fT4 concentration (low and high) and mixing them with each other and buffer solution in different proportions. According to the measurements, linear range of kit is 5-100 pmol/L $\pm 10\%$.

13.1.4 Analytical sensitivity

Limit of detection (LoD) – the lowest fT4 concentration in the serum or plasma sample that is detected by the fT4 EIA kit is no lower than 0.75 pmol/L.

Limit of quantification (LoQ) – the lowest concentration of the analyte in the sample that is determined quantitatively with the declared trueness for fT4 EIA kit is 5 pmol/L.

13.1.5 Analytical specificity

For the analysis result is not affected by the presence in the sample of bilirubin in a concentration of up to 0.21 mg/mL and hemoglobin in a concentration of up to 10 mg/mL.

The cross-reactivity of fT4 with other analytes is shown in the table:

Analyte	Cross-reactivity, %
L-Thyroxin	100
D-Thyroxin	94
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (Reverse T3)	86
3,3',5-Triiodo-L-Thyronine (T3)	3.3
3,3',5'-Triiodo-D-Thyronine	1.8
3,3',5'-Triiodothyropropionic acid	0.6

14. REFERENCES

1. Tietz, N. W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd Ed., pg. 602, Saunders Press, Phila., 1976.
2. Horworth, P. J. N., Ward, RL., J. Clin Pathol. 1972; 25:259-62.
3. Sati, C., Chatter, A. J., Watts, N. Fundamentals of Clinical Chemistry. Ed. Tietz, N. W. 3rd Ed., pg. 586. Saunders press Phila. 1987.
4. Lundberg, P. A., Jagenburg, R., Lindstedt, G., Nystrom, E., Clin. Chem. 1982, 28:1241.
5. Melmed, S., Geola, F. L., Reed, A. W., Pekary, A. E., Park, J., Hershmen, J. M., Clin Endocrin. Metabol. 1982, 54; 300.
6. Наказ МОЗ України №325 від 08.06.2015 «Про затвердження Державних санітарно-протиепідемічних правил і норм щодо поведження з медичними відходами».
7. Постанова КМУ від 02 жовтня 2013р. №754 «Про затвердження технічного регламенту щодо медичних виробів для діагностики in vitro».
8. НПАОП 85.14-1.09-81. Правила облаштування, техніки безпеки, виробничої санітарії, протиепідемічного режиму і особистої гігієни при роботі в лабораторіях (відділеннях, відділах) санітарноепідеміологічних установ системи Міністерства охорони здоров`я СРСП (НАОП 9.1.50-1.09-81)

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN













	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

SAMPLES IDENTIFICATION PLAN

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

LOT _____ DATE _____

	Manufacturer
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
 YYYY-MM	Use-by date
	Batch code
	Temperature limit
	Contains sufficient for <n> tests
	Caution
	Consult instructions for use
	Conformity Marking with technical regulations in Ukraine
	Authorized representative in the European Community/European Union
	CE Conformity Marking

**For any issues related to operation of the kit and technical support,
please contact by telefon number**

+38 044 294-69-78

or write to:

qa@xema.com.ua



XEMA LLC
Akademika Yefremova St. 23
03179, Kyiv, Ukraine
tel.:+38 044 422-62-16
tel.:+38 044 294-69-78
E-mail: qa@xema.com.ua
www.xema.in.ua