



DiaSorin Italia S.p.A.UK Branch,
Central Rd, Dartford DA1 5LR, UK
www.diasorin.com
Tel. +44 1322 317949

en

REF 7G79-09 / 11

GE41/42

Revised August, 2023

Murex HIV Ag/Ab Combination

2.1. Reagentai yra skirti ŽIV1/2 antikūnų/p24antigeno nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 480 testų. Visos tyrimo inkubacijos atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 5 šulinėliai.

Enzyme immunoassay for improved detection of seroconversion to human immunodeficiency virus types 1 (HIV-1, HIV-1 group O) and detection of anti-HIV-2 antibodies.

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1, including group O, and HIV-2 or as an aid to the diagnosis of HIV infection.

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

These instructions for use must be read carefully prior to use. The instructions for use must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions for use.

IVD

Key to symbols used			
	List Number		<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	Lot Number		Store at 2-8°C
	Expiration Date		CAUTION: Consult accompanying documents
	Manufacturer		Consult instructions for use
			Keep away from sunlight

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.

INTENDED PURPOSE

The Murex HIV Ag/Ab Combination is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of HIV p24 antigen and antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1, HIV-1 group O) and type 2 (HIV-2) in human serum or plasma samples. The assay is intended to screen individual human donors for the presence of HIV p24 antigen and antibodies to HIV-1, including group O, and HIV-2. It is also intended as an aid to the diagnosis of HIV infection in individuals with or without the symptoms of HIV. This assay is intended for *in-vitro* diagnostic use, on either a semi-automated or automated platform.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

HIV stands for human immunodeficiency virus and it can lead to acquired immunodeficiency syndrome or AIDS if not treated. HIV is a retrovirus, with two subtypes: HIV-1 and HIV-2¹. The HIV-1 subtype is the most common and responsible for AIDS throughout most of the world, while HIV-2 is found primarily in Western Africa.

HIV has a worldwide and pandemic distribution² and, since its identification, 39 million people have died from HIV infection and more than 35 million people are currently living with HIV infection³. HIV transmission occurs through sexual contact between HIV-infected individuals, exposure to contaminated blood or blood products, and prenatal infection of a fetus or perinatal infection of a newborn from an infected mother⁴.

HIV has a general tropism for the immune system, specifically the CD4 cells (T cells), leading opportunistic infections or cancers development during the last stage of HIV infection. The disease is characterized by three different stages: acute HIV infection, within the first 2-4 weeks, clinical latency, which can last decades with low viral reproduction and the AIDS phase^{5, 6}.

During the course of infection, several immunological and viral markers appear and can be monitored and used to identify HIV infection: HIV RNA, HIV p24 antigen (coded by the gag gene), and antibodies to HIV antigens. The time interval before HIV-specific antibodies appear is known as the serological "window period". The detection of specific antibody to HIV defines the end of the window period and labels the individual as "seropositive"⁷.

The introduction of fourth generation serological assays, able to detect both HIV p24 antigen and HIV-1/2 antibodies, allows the earlier identification of infected individuals and can shorten the diagnostic window period⁸.

Transfusion-transmitted infection risk continue to be a big challenge and the screening of blood and blood products for the presence of HIV plays an essential role in the prevention of HIV infections. The implementation of nucleic acid testing (NAT) together with the existing antigen/antibody-based assays for donors screening has further reduced the residual risk of recipient's infection⁹⁻¹¹.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Murex HIV Ag/Ab Combination is based on microwells coated with synthetic peptide representing immunodominant regions of HIV-1 (O) and HIV-2, recombinant protein derived from the envelope regions of HIV-1 and HIV-2 and HIV pol protein, together with monoclonal antibodies raised against p24 of HIV-1. The Conjugate is a mixture of the same antigen epitopes, and different monoclonal antibodies, also raised against p24, all labelled with horseradish peroxidase.

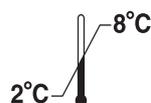
Test specimens and control sera are incubated in the wells and reactive HIV core and/or antibodies to HIV in the sample or control sera bind to the antibodies and/or antigens on the microwell; sample and any excess antibodies are then washed away. In a subsequent step, Conjugate is added which in turn binds to any reactive HIV core and/or specific antibody already bound to the reagents on the well. Samples not containing reactive core antigen or specific antibody will not cause the Conjugate to bind to the well.

Unbound Conjugate is washed away and a solution containing 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added to the wells. Wells with bound Conjugate develop a blue green colour which is converted to an orange colour which may be read at 450 nm after the reaction has been stopped with sulphuric acid.

REAGENTS

DESCRIPTION, PREPARATION FOR USE AND RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS

See also **Warnings and Precautions**.



All components must be stored at 2 to 8°C, unless otherwise stated, under which condition they will retain activity until the expiry date of the kit.

COATED	WELLS
--------	-------

1. Coated Wells

One plate (7G79-09) or five plates (7G79-11) of 96 microwells coated with HIV antigens (0.02 to 0.25 µg/mL) and monoclonal antibodies (0.6 µg/mL).

Allow the wells to reach room temperature (18 to 30°C) before removal from the bag.

Place unused wells in the sealable storage bag provided and return to 2 to 8°C.

SAMPLE	DIL
--------	-----

2. Sample Diluent

One bottle containing 8 mL (7G79-09) or 18 mL (7G79-11) of a green/brown buffer solution, bovine and murine protein, detergent and saponin. Contains 0.05% ProClin[®] 300 preservative.

CONJUGATE

3. Conjugate

One bottle (7G79-09) or three bottles (7G79-11) containing 1.1 mL of HIV antigens (0.2 to 1.8 µg/mL) and monoclonal antibodies (0.6 to 2.5 µg/mL) conjugated to horseradish peroxidase and freeze dried. When reconstituted each bottle is sufficient for up to two plates.

CONJUGATE	DIL
-----------	-----

4. Conjugate Diluent

One bottle (7G79-09) or three bottles (7G79-11) containing 22 mL of a yellow solution consisting of buffer, bovine protein, saponin and detergent, sufficient to reconstitute one bottle of Conjugate. Contains 0.1% ProClin[®] 300 preservative.

Reconstitution of Conjugate

Tap the bottle of Conjugate gently on the bench to remove any material adhering to the rubber stopper. Pour the whole contents of the bottle of conjugate diluent into the bottle of conjugate, recap the latter and mix by gentle inversion. Allow to rehydrate for at least 30 minutes with occasional swirling. The reconstituted conjugate will be red in colour. Reconstituted conjugates may be returned to and pooled in the plastic conjugate diluent bottles if required.

After reconstitution the Conjugate may be stored at 2 to 8°C for up to four weeks.



5. Anti-HIV-1 Positive Control

One bottle containing 1.7 mL of inactivated human serum in a buffer containing bovine protein. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.



6. Anti-HIV-2 Positive Control

One bottle containing 1.7 mL of inactivated human serum in a buffer containing bovine protein. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.



7. HIV-1 p24 Positive Control

One bottle containing 1.7 mL of p24 (recombinant antigen) in a buffer containing bovine protein. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.



8. Negative Control

Two bottles containing 2.5 mL of normal human serum diluted in a bovine protein buffer. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.



9. Substrate Diluent

One bottle containing 35 mL of a colourless solution of tri-sodium citrate and hydrogen peroxide.



10. Substrate Concentrate



One bottle containing 35 mL of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and stabilisers in an orange solution.

Substrate Solution

To prepare the Substrate Solution add a volume of colourless Substrate Diluent to an equal volume of orange Substrate Concentrate in either a clean glass or plastic vessel. **It is important that this order of addition is followed and that any pipettes and glassware used to prepare Substrate Solution are clean.** Alternatively, the Substrate Solution may be made by pouring the entire contents of the bottle of Substrate Diluent into the bottle of Substrate Concentrate. One bottle of Substrate Solution provides sufficient reagent for at least five plates - see **Table 1**.

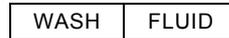
Table 1
Volume of Substrate Concentrate and Substrate Diluent Required

Number of Wells	Number of Plates
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 96	1 2 3 4
Substrate Concentrate (mL)	
0.5 1.0 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 6.0	6 12 18 22
Substrate Diluent (mL)	
0.5 1.0 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 6.0	6 12 18 22

Additional reagent may be required for use with automated systems. Keep away from all natural and artificial light. The Substrate Solution should be pale yellow; if it is green before being used it should be discarded and fresh Substrate Solution prepared.

The prepared Substrate Solution from this kit may be used interchangeably with that from all other Murex kits which use orange coloured Substrate Concentrate. Ensure that the Substrate Solution is prepared from the Substrate Diluent and Substrate Concentrate provided together.

The prepared Substrate Solution is stable refrigerated (2 to 8°C) or at 15 to 25°C for up to two days but it must be discarded if crystals have formed.



11. Wash Fluid

One (7G79-09) or two (7G79-11) bottles containing 125 mL of 20 times working strength Glycine/ Borate Wash Fluid. Contains 0.2% Bronidox[®] preservative.

Add one volume of Wash Fluid Concentrate to 19 volumes of distilled or deionised water to give the required volume or dilute the entire contents of one bottle of Wash Fluid to a final volume of 2500 mL. Crystals may be observed in the Wash Fluid Concentrate but these crystals will dissolve when the Wash Fluid is diluted to working strength. When diluted the Wash Fluid contains 0.01% Bronidox[®] preservative.

The Wash Fluid from this kit may be used interchangeably with the Glycine/Borate Wash Fluid from any other Murex kit.

Store the working strength Wash Fluid at 18 to 30°C in a closed vessel under which conditions it will retain activity for one month.

NOTE: The Wash Fluid may develop a yellow colour on storage. This will have no effect on the performance of the assay providing the Wash Fluid is fully aspirated from the wells.

NOTE: Although the Substrate Solution and Wash Fluid are interchangeable, they must not be used beyond the expiry date printed on the component labels.

WARNINGS AND PRECAUTIONS



The reagents are for *in vitro* diagnostic use only.

For professional use only.

Please refer to the manufacturer's safety data sheet and the product labelling for information on potentially hazardous components.

Low levels of fibrin precipitate may be observed in the Kit Controls and product performance is not affected by this. This is a product of certain serum batches used to manufacture the controls.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION



CAUTION: This kit contains components of human origin.

The human sera used for manufacture have been screened and found reactive or non-reactive for analytes as shown in **Table 2** below.

Table 2

Component	Reactive for	Non-reactive for
Negative Control	N/A	HBsAg, antibodies to HCV, HIV-1 and HIV-2
Positive Control 1	antibodies to HIV-1	HBsAg
Positive Control 2	antibodies to HIV-2	HBsAg

Additionally human sera used for positive controls are also tested for antibodies to HCV and may be reactive. All reactive serum used has been inactivated prior to use in reagent preparation. However, all material of human origin should be considered as potentially infectious and it is recommended that this kit and test specimens be handled using established good laboratory practice.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP) hazardous reagents are classified and labeled as follows:

Reagents:	CONJUGATE DIL	SAMPLE DIL	CONJUGATE*
Classification:	Skin sens. 1 H317		
Signal Word:	Warning		
Symbols / Pictograms:			
Hazard Statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.		
Precautionary Statements:	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P363 Wash contaminated clothing before reuse. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice / attention.		
Contains:	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).		
* The reconstituted Conjugate contains 0.1% ProClin® 300 which is classified hazardous per EC Regulation 1272/2008.			

Reagents:	SUBSTRATE	CONC
Classification:	Eye Irrit. 2 H319	
Signal Word:	Warning	
Symbols / Pictograms:		
Hazard Statements:	H319 Causes serious eye irritation	
Precautionary Statements:	P264 Wash hands thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.	

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP), WASH FLUID is labeled as EUH210, safety data sheets available on request.

For additional information see Safety Data Sheets available on www.diasorin.com

- Potentially contaminated materials should be disposed of safely according to local requirements.
- Spillage of potentially infectious material should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued¹². Sodium hypochlorite should not be used on acid containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
- Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.

- Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- If any of the reagents come into contact with the skin or eyes wash the area extensively with water.
- Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If either come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.

ANALYTICAL PRECAUTIONS

- Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
- Do not modify the **Test Procedure** or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
- Allow all reagents and samples to come to 18 to 30°C before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
- Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionised water.
- Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of reagents and samples.
- Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
- Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
- Do not cross-contaminate reagents. Dedicate a pipette for use with the Substrate Solution of Murex assays. A pipette should also be dedicated for use with the Conjugate.
- The Sample Diluent in this assay has the potential to cause false positive results in anti hepatitis B surface antigen (anti-HBs) assays if reagent cross contamination occurs.
If running Murex HIV Ag/Ab Combination in conjunction with an anti-HBs assay on a fixed tip instrument ensure that the possibility of cross contamination is excluded during the validation process.
- Do not touch or splash the rim of the well with Conjugate. Do not blow out from micropipettes; reverse pipetting is recommended whenever possible.
- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
- Do not contaminate microwells with dust from disposable gloves.
- When using fully automated processors
 - It is not necessary to use plate lids and tap dry the wells.
 - Do not allow system fluids to contaminate samples or reagents.
 - The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assays on fully automated processors.
- Ensure the assay is run within the temperature limits defined in the assay protocol.
- Do not use CO₂ incubators.
- Do not store the Stop Solution in a shallow dish or return it to a stock bottle after use.
- The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assay protocols on instrumentation.

2.1. Reagentai yra skirti ŽIV1/2 antikūnų/p24antigeno nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 480 testų. Visos tyrimo inkubacijos atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 5 šulinėliai.

SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

SPECIMEN COLLECTION

Serum, EDTA plasma or citrate plasma samples may be used. Ensure that the serum samples are fully clotted. Remove any visible particulate matter from the sample by centrifugation. If samples are prepared using liquid anti-coagulants e.g. citrate plasma, the dilution effect should be considered.

SPECIMEN TRANSPORT AND STORAGE

Store samples at 2 to 8°C. Samples not required for assay within 72 hours should be removed from the clot or cell pellet and stored frozen (-15°C or colder). Avoid multiple freeze-thaw cycles. Samples may be stored frozen for up to 3 months. After thawing ensure samples are thoroughly mixed before testing.

PROCEDURE

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid)**, e.g. add between 3.0 mL (for 0.5M) and 11 mL (for 2.0M) of analytical grade concentrated sulphuric acid (18M) to about 80 mL of distilled or deionised water and then make up to 100 mL with more water. Alternatively, the following reagent can be used: 1N Sulphuric Acid (Code N0164 - 15 vial pack and N0165 - 1 vial pack).
- Freshly distilled or high quality deionised water** is required for dilution of Wash Fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
- Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
- Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
- Moulded Heating Block** (Code 5F09-02). For use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
- Instrumentation**
 - Automated microplate stripwasher,
 - Microplate reader, or
 - Fully automated microplate processor.

All instruments must be alidated before use.
Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
- Disposable Reagent Troughs**. (Code 5F24-01).
- Sodium hypochlorite** for decontamination. (Refer to **Health and Safety Information**).
- Sodium hydroxide solution** (0.1M). (For Instrument decontamination).

TEST PROCEDURE

Please read **Analytical Precautions** carefully before performing the test.
Addition of the various components of the assay to the wells may be confirmed visually by examining the plate for the following colours:

Sample Diluent is green/brown in colour. On addition of Sample or Control the colour will change to blue/green. The colour change will vary from sample to sample but some change should always be visible. The addition of sample or control may be confirmed using a microplate reader at 570 nm or 620 nm with a reference of 690 nm.

Reconstituted Conjugate is red in colour. The addition of Conjugate may be confirmed using a microplate reader at 490 nm with a reference of 690 nm.

Substrate Solution is initially pale yellow with any reactive wells becoming blue green. On addition of Stop Solution the blue green colour of the reactives will change to orange, whilst the negatives will change to pink. The addition of Substrate Solutions may be confirmed using a microplate reader at 450 nm (no reference).

SEMI AUTOMATED PROCESSING

Step 1	Reconstitute and mix the Conjugate , prepare the Substrate Solution and Wash Fluid .	
Step 2	Use only the number of wells required for the test. Avoid touching the tops or bottoms of the wells.	
Step 3	Add 25 µL of Sample Diluent to each well.	25 µL
Step 4	Add 100 µL of Samples or 100 µL Controls to the wells. For each plate use the first column of wells for the assay Controls. Add the Controls to the designated wells after dispensing the samples. Pipette 100 µL of the Negative Control into each of three wells A1 to C1 and 100 µL of the p24, anti-HIV-1 and HIV-2 Positive Controls into wells D1 to F1 respectively. Use of a white background will aid visualization of sample addition.	100 µL
Step 5	Cover the wells with the lid and incubate for 60 minutes at 37°C ±1°C	60 mins
Step 6	At the end of the incubation time wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 7	Immediately after washing the plate, add 100 µL of Conjugate to each well	100 µL
Step 8	Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 mins
Step 9	At the end of the incubation time wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 10	Immediately after washing the plate, add 100 µL of Substrate Solution to each well.	100 µL
Step 11	Cover the wells with a lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C. Keep away from direct sunlight. A blue green colour should develop in wells containing reactive samples.	30 mins
Step 12	Add 50 µL of Stop Solution (0.5M to 2M sulphuric acid) to each well.	50 µL
Step 13	Within 15 minutes read the absorbance at 450 nm using 620 nm to 690 nm as the reference wavelength if available. Blank the instrument on air (no plate in the carriage).	A₄₅₀

WASH PROCEDURES

Protocols for recommended washers and procedures for verifying washers and analysers can be obtained from your representative. The following protocol is recommended:

a. Protocol for automated stripwasher

Perform 5 wash cycles using working strength Wash Fluid. Ensure, where possible, that:

- i) Flow-through washing with a volume of 500 µL/well is used with instrumentation supplied by DiaSorin. When using other instrumentation for which this is not possible, ensure that the well is completely filled.
- ii) The dispense height is set to completely fill the well, with a slight positive meniscus, without causing an overflow.
- iii) The time taken to complete one aspirate/wash/soak cycle is approximately 30 seconds.
- iv) Ensure that no liquid is left in the well (by use of a double aspirate step in the final cycle where possible).
- v) After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbant paper.

NOTE: Do not allow the wells to become dry during the assay procedure.

Washers must be rinsed with distilled or deionised water at the end of the test to avoid blockage and corrosion.

FULLY AUTOMATED PROCESSORS

Contact your representative for details of currently available validated protocols. For instrumentation without established validated protocols, the following guidelines are recommended:

1. Do not programme times shorter than specified in the procedure.
2. For each incubation at 37°C, programmed times may be increased by up to 5 minutes.
3. Ensure all **Analytical Precautions** are followed. Protocols written following these guidelines must be fully validated prior to use according to local procedures

RESULTS

CALCULATION OF RESULTS

Each plate must be considered separately when calculating and interpreting results of the assay.

Approved software may be used for calculation and interpretation of results.

Negative Control

Calculate the mean absorbance of the Negative Controls.

Example:

Well 1	=	0.084	
Well 2	=	0.086	
Well 3	=	0.070	
Total	=	0.240	
Mean Negative Control	=	0.240/3	= 0.080

If one of the Negative Control Wells has an absorbance more than 0.15 O.D. above the mean of all three, discard that value and calculate the new Negative Control mean from two remaining replicates.

Cut-off value

Calculate the Cut-off value by adding 0.150 to the mean of the Negative Control replicates (see above).

Mean Negative Control	=	0.080	
Cut-Off value	=	0.080+0.150	=0.230

QUALITY CONTROL

Results of an assay are valid if the following criteria for the controls are met:

Negative Control

The mean absorbance is less than 0.15.

Positive Controls

The absorbance of each of the Positive Controls is more than 0.8 above the mean absorbance of the Negative Control.

Assays which do not meet these criteria should be repeated.

In the unlikely event of the results repeatedly failing to meet either the Quality Control criteria or the expected performance of the test, please contact your representative.

INTERPRETATION OF RESULTS

Non-reactive Results

Samples giving an absorbance less than the Cut-off value are considered negative in the assay.

Reactive Results

Samples giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off value are considered initially reactive in the assay (see **Limitations of the Procedure**).

Unless local procedures state otherwise, such samples **must** be retested in duplicate using the original source. Samples that are reactive in at least one of the duplicate retests are considered repeatedly reactive in Murex HIV Ag/Ab Combination and are presumed to contain reactive HIV core antigen and/or antibodies to HIV-1 or HIV-2. Such samples **must** be further investigated and the results of this assay considered with any other clinical and/or assay information. Samples that are non-reactive in both wells on retest are considered non-reactive for HIV core antigen and HIV antibodies.

No sample addition

Absorbance values significantly higher than the Negative Control may be obtained in wells where the sample has been omitted but all the reagents have been added.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Murex HIV Ag/Ab Combination has been determined by testing samples from random blood donors, patients with AIDS diagnosed according to CDC criteria, patients with AIDS Related Complex (ARC), other patients with known antibody to HIV-1 (including group O), patients with confirmed HIV-2 infection and patients at risk of HIV infection or in other clinical categories. In addition, its performance on commercially available seroconversion panels has been evaluated.

Diagnostic Sensitivity

A total of 497 specimens from patients with confirmed HIV-1 infection were tested and found to be reactive with Murex HIV Ag/Ab Combination. The specimens were taken from patients at various stages of HIV infection and included 24 specimens from patients with HIV-1 subtype O infection and a further 139 specimens from patients infected with HIV-1 subtypes other than subtype B.

In addition a total of 100 specimens from patients with confirmed HIV-2 infection were also tested with Murex HIV Ag/Ab Combination and found to be reactive.

The diagnostic sensitivity of Murex HIV Ag/Ab Combination on this population of specimens is therefore estimated to be 100% (597/597) with a lower 95% confidence limit of 99.38% (593/597) by the binomial distribution.

A total of 32 commercial HIV-1 seroconversion panels were tested with Murex HIV Ag/Ab Combination. Using the presence of both core (p24) and an envelope (gp120/160) band on Western blot as the reference criteria, Murex HIV Ag/Ab Combination detected antibody to HIV earlier or in the same sample as Western blot in all of the panels.

A total of 68 cell culture supernatants including HIV-1 and HIV-2 and 80 HIV-1 antigen positive specimens were tested with the Murex HIV Ag/Ab Combination and correctly identified.

Analytical sensitivity

Sensitivity on AFSSAPS HIV Ag Standard

Sensitivity of Murex HIV Ag/Ab Combination on the AFSSAPS HIV Ag standard was determined at three testing centres.

Table 3
AFSSAPS HIV Ag standard

Centre	Sensitivity HIV Ag pg/mL
1	31
2	28
3	25
Mean	28

The data shown in Table 3 was obtained during this testing but may not be exactly reproducible on other testing occasions.

Sensitivity with the First International Reference Reagent HIV-1 p24 Antigen NIBSC code 90/636

The sensitivity of the First international reference reagent HIV-1 p24 Antigen NIBSC code 90/636 with Murex HIV Ag/Ab Combination was determined to be 0.977 IU/mL.

Diagnostic Specificity

The Murex HIV Ag/Ab Combination assay demonstrated a specificity of ≥99.5% in a study where specimens from a European blood donor population were tested. A total of 9,290 routine donor plasma specimens were screened with Murex HIV Ag/Ab Combination at three European blood transfusion centres. The results are summarised in Table 3. In the study, 99.77% (9269/9290) of specimens were non-reactive and 0.23% (21/9290) were repeatedly reactive. One of the repeatedly reactive specimens was weakly positive with the Murex HIV Antigen mAb (8E77). None of the remaining 20 specimens were confirmed as positive for the presence of HIV-1 antigen or antibody to HIV-1 or HIV-2.

The specificity of Murex HIV Ag/Ab Combination on presumed negative European blood donors is estimated to be 99.78% (9269/9289) with 95% confidence limits of 99.67% (9258/9289) to 99.87% (9277/9289) by the binomial distribution.*

A total of 272 specimens from patients with conditions unrelated to HIV infection were also tested with Murex HIV Ag/Ab Combination. These included specimens from pregnant women and patients suffering with autoimmune disease and other acute viral infections. A total of five specimens were reactive with Murex HIV Ag/Ab, four were reactive with two other commercially available screening assays. In Western blot studies four produced indeterminate results and one was negative.

In addition, 30 lipaemic, icteric and haemolysed specimens were also tested and found to be non-reactive. 10 HAMA positive specimens were tested and found to be non-reactive.

The overall diagnostic specificity of Murex HIV Ag/Ab Combination on confirmed negative specimens during this performance evaluation is estimated to be 99.78% (9561/9582) with 95% confidence limits of 99.67% (9550/9582) to 99.86% (9568/9582) by the binomial distribution.*

*Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories and with different populations may vary.

Table 4
Reactivity of Murex HIV Ag/Ab Combination with presumed negative specimens from routine European blood donors

Centre	Number of presumed negative specimens tested	Number of repeatedly reactive specimens
A	3095	6 ^a (0.19%)
B	2803	9 (0.32%)
C	3392	6 (0.18%)
TOTAL	9290	21 (0.23%)

^a Includes one specimen which was weakly positive in Murex HIV Antigen mAb (8E77).

Analytical Specificity

Controlled studies of the potentially interfering substances showed no interference at the concentrations for each substance summarised in Table 5 for the Murex HIV Ag/Ab Combination.

Table 5
Performance with potentially interfering substances

Substance (Endogenous)	Concentration tested
Total protein – low	No Interference at 50 g/L
Triglycerides	No Interference at 3000 mg/dL
Vitamin H (Biotin)	No Interference at 3500 ng/mL
Unconjugated bilirubin	No Interference at 40 mg/dL
Conjugated bilirubin	No Interference at 40 mg/dL
Cholesterol	No Interference at 400 mg/dL

Substance (Exogenous)	Result
Adefovir dipivoxil	No Interference at 10 mg/L
Entecavir	No Interference at 0.5 mg/L
Lamivudine	No Interference at 300 mg/L
Tenofovir	No Interference at 0.0978 mg/dL
Acetaminophen	No Interference at 15.6 mg/dL
Emtricitabine	No Interference at 0.9 mg/dL
Interferon alpha 2a	No Interference at 6000 IU/mL
Interferon alpha 2b	No Interference at 6000 IU/mL
Interferon alpha 1b (IFN-alpha-1)	No Interference at 6000 IU/mL
Ibuprofen	No Interference at 21.9 mg/dL
Telbivudine	No Interference at 600 mg/L
Vitamin C (L-Ascorbic acid)	No Interference at 300 mg/L
Sofosbuvir	No Interference at 0.190 mg/dL

Assay Reproducibility

The reproducibility of Murex HIV Ag/Ab Combination was assessed by testing two of the assay controls and four quality assurance panel members as ten replicates on four separate occasions. The results from the testing are summarised in Table 6.

Table 6
Murex HIV Ag/Ab Combination - Assay Reproducibility

Specimen	Number of Assays	Number of Replicates	Mean Absorbance/Cut-off ratio	Intra-assay %CV	Inter-assay %CV
Negative Control	4	10	0.266	8.7	11.3
HIV-1 Positive Control	4	10	8.287	4.3	4.7
QA01	4	10	3.672	4.6	7.3
QA02	4	10	4.696	5.6	12.9
QA03	4	10	3.006	3.9	4.2
QA04	4	10	1.663	6.8	9.2

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The **Test Procedure** and **Interpretation of Results** must be followed.
2. This test has only been evaluated for use with individual (unpooled) serum, EDTA plasma or citrate plasma samples.
3. A negative result with an antigen/antibody detection test does not preclude the possibility of infection with HIV.
4. A positive result with Murex HIV Ag/Ab Combination should be confirmed by at least one other test.
5. Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.
The most common sources of error are:
 - a) Imprecise delivery of Sample, Conjugate or Substrate into the wells.
 - b) Contamination of Substrate with Conjugate.
 - c) Contamination with conjugates from other assays.
 - d) Blocked or partially blocked washer probes.
 - e) Insufficient aspiration leaving a small volume of Wash Fluid in the wells.
 - f) Failure to ensure that the bottom surface of the wells is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before a plate is read.
 - g) Failure to read at the correct wavelength (450 nm) or use of an incorrect reference wavelength (not 620 nm to 690 nm).
6. The use of highly haemolysed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
7. Samples which contain higher than normal physiological concentrations of total protein may give rise to erroneous results.
8. This test has not been evaluated for use with samples from cadavers.

Summary of safety and performance is available on EUDAMED.

For EU only: Please be aware that any serious incident that has occurred in relation to this IVD medical device shall be reported to DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch and the Competent Authority of the EU Member State in which the user and/or the patient is established.

BIBLIOGRAPHY

1. **Sharp PM** et al. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011 Sep;1(1).
2. **Becerra** et al. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. Microb Cell. 2016 Sep 05;3(9):451-475.
3. **Poorolajal J.** et al. Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. Public Health. 2016 Oct;139:3-12.
4. **Shaw G.M.** and Hunter E. HIV Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2.
5. **Parekh BS.** et al. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. Clin Microbiol Rev. 2018 Nov 28;32(1).
6. **Pandey D.** et al. HIV Infection: A Review of Their Inhibitors Progression. Biomed Pharmacol J 2017;10(2).
7. **Buttò S.** et al. Laboratory diagnostics for HIV infection. Ann Ist Super Sanita. 2010;46(1):24-33.
8. **Bangalee A.** et al. Evaluation of serological assays for the diagnosis of HIV infection in adults. S Afr Fam Pract (2004). 2021 Oct 25;63(1):e1-e5.
9. **Dwyre DM.** et al. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. Vox Sang. 2011 Jan;100 (1):92-8.
10. **Salles NA.** Detection of HIV-1 infections in blood donors during the pre-seroconversion window period in São Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019 May 16;52.
11. **WHO.** (2017) Blood safety and availability. Fact sheet.
12. **Centres for Disease Control.** (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox[®] and ProClin[®] are not trade marks of DiaSorin.



DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123



DiaSorin Italia S.p.A.
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

F01DS41GB
August, 2023

Peržiūrėta 2023 m.
rugpjūčio mėn.

Murex HIV Ag/Ab Combination

Imunofermentinis tyrimas, skirtas pagerintam serokonversijos 1 tipo žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV-1, ŽIV-1 O grupės) aptikimui ir antikūnų prieš ŽIV-2 aptikimui.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į ŽIV p24 antigeno ir antikūnų prieš ŽIV 1, įskaitant O grupę, ir ŽIV 2 buvimą arba kaip ŽIV infekcijos diagnostikos priemonę.

Klientų aptarnavimas

Dėl papildomos informacijos apie produktą susisiekite su vietos klientų aptarnavimo organizacija.

Prieš naudojimą reikia atidžiai perskaityti šias naudojimo instrukcijas. Būtina rūpestingai laikytis naudojimo instrukcijų. Esant nukrypimų nuo naudojimo instrukcijų, tyrimo rezultatų patikimumo garantuoti negalima.

IVD

Pagrindiniai naudojami simboliai

	Sąrašo numeris		<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas
	Serijos numeris		Laikyti 2-8°C temperatūroje
	Galiojimo terminas		ATSARGIAI. Žr. pridėtus dokumentus
	Gamintojas		Žr. naudojimo instrukcijas
			Saugoti nuo saulės šviesos

Reagento komponentų pavadinimuose naudojamų simbolių išsamų paaiškinimą galite rasti skyriuje **REAGENTAI**.

NUMATYTOJI PASKIRTIS

„Murex HIV Ag/Ab Combination“ – tai imunofermentinis tyrimas, skirtas kokybiniam ŽIV p24 antigenų ir antikūnų prieš 1 tipo (ŽIV 1, O grupės ŽIV 1) ir 2 tipo (ŽIV 2) žmogaus imunodeficito virusą žmogaus serume arba plazmoje aptikimui. Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrenkamajam tikrinimui dėl ŽIV p24 antigeno ir antikūnų prieš ŽIV 1, įskaitant O grupę, ir ŽIV 2 buvimo. Jis taip pat skirtas naudoti kaip ŽIV infekcijos diagnostikos priemonė asmenims, turintiems ir neturintiems ŽIV simptomų. Šis tyrimas skirtas *in vitro* diagnostikai pusiau automatinėje arba automatinėje platformoje.

SANTRAUKA IR TYRIMO PAAIŠKINIMAS

Santrumpa ŽIV reiškia žmogaus imunodeficito virusą, kuris, negydant infekcijos, gali sukelti įgytą imunodeficito sindromą, žinomą angliška santrumpa AIDS. ŽIV yra retrovirusas ir būna dviejų potipių: ŽIV 1 ir ŽIV 2¹. Dažniausiai pasitaiko ŽIV 1 potipis, sukeliantis AIDS didžiojoje pasaulio dalyje, o ŽIV 2 pasitaiko daugiausia Vakarų Afrikoje.

ŽIV pandemiškai paplitęs visame pasaulyje², po jo atradimo nuo ŽIV infekcijos mirė 39 milijonai žmonių, o daugiau kaip 35 milijonai žmonių šiuo metu gyvena užsikrėtę ŽIV³. ŽIV perduodamas per lytinį kontaktą su ŽIV infekuotu asmeniu, per sąlytį su užkrėstu krauju arba kraujo preparatais, vaisiui prenataliniu laikotarpiu arba naujagimiui perinataliniu laikotarpiu užsikrėtus nuo infekuotos motinos⁴.

ŽIV iš esmės būdingas tropizmas imuninei sistemai, konkrečiai – CD4 ląstelėms (T ląstelėms), dėl to paskutinėje ŽIV infekcijos stadijoje kyla oportunistinės infekcijos arba vystosi vėžys. Ligai būdingos trys skirtingos stadijos: ūminė ŽIV infekcija (pirmosiomis 2–4 savaitėmis po užsikrėtimo); klinikinė latencija (esant menkam virusų dauginimuisi galinti trukti dešimtmečius) ir AIDS fazė^{5, 6}.

Progresuojant infekcijai atsiranda keletas imunologinių ir virusinių žymenų, kuriuos galima stebėti ir naudoti ŽIV infekcijai identifikuoti: ŽIV RNR, ŽIV p24 antigenas (koduojamas gag geno) ir antikūnai prieš ŽIV antigenus. Laikotarpis, per kurį atsiranda ŽIV savitųjų antikūnų vadinamas serologinės diagnostikos lango periodu. Aptikus savitųjų antikūnų prieš ŽIV, diagnostikos lango periodas baigiasi ir asmens būklė vadinama serologiškai teigiama⁷.

Atsiradus ketvirtosios kartos serologinių tyrimų (RDT, EIA, CLIA, ECL), kuriais aptinkami ir ŽIV p24 antigenai, ir ŽIV 1/2 antikūnai, galima nustatyti infekuotus asmenis anksčiau ir diagnostikos lango periodas gali būti trumpesnis⁸.

Perpilant kraują perduodamų infekcijų rizika išlieka didele problema, o kraujo ir kraujo preparatų atrenkamasis tikrinimas dėl ŽIV tebėra esminė užduotis, siekiant užkirsti kelią užsikrėsti ŽIV. Liekamoji rizika užsikrėsti infekcijomis recipientams dar labiau sumažėjo, kartu su anksčiau donorų atrenkamajam tikrinimui naudotais antigenų / antikūnų tyrimais įvedus mažųjų telkinių nukleorūgščių testavimą (angl. *Nucleic Acid Testing*, NAT)^{9–11}.

PROCEDŪROS PRINCIPAS

„Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimas atliekamas naudojant mikrošulinėlius, dengtus sintetiniu peptidu iš imunodominantiųjų ŽIV-1 (O) ir ŽIV-2 sričių, rekombinaciniu baltymu iš ŽIV-1 ir ŽIV-2 apvalkalo regionų bei ŽIV-2 ir ŽIV pol baltymo, kartu su monokloniniais antikūnais prieš ŽIV-1 p24. Konjugatas yra to paties antigeno epitopų ir skirtingų monokloninių antikūnų, taip pat susidariusių prieš p24, mišinys (visi jie pažymėti krienų peroksidaze).

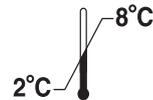
Ėminius ir kontrolės serumus inkubuojant šulinėliuose, mėginyje arba kontrolės serume esantys reaguojantys ŽIV šerdies antigenai ir (arba) antikūnai prieš ŽIV rišasi su mikrošulinėlio antikūnais ir (arba) antigenais; po to mėginys ir antikūnų perteklius nuplaunami. Sekantis veiksmas: pridedama konjugato, staigiai susijungiančio su jau su reagentu šulinėlyje surištais reaguojančiu ŽIV šerdies antigenu ir (arba) specifiniais antikūnais. Jeigu reaguojančiojo šerdies antigeno arba specifinių antikūnų mėginyje nėra, konjugatas su šulinėlio medžiagomis nesijungs.

Nesurištas konjugatas išplaunamas ir į šulinėlius įpilama tirpalo su 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidinu (TMB) bei vandenilio peroksidu. Šulinėliai, kuriuose yra surišto konjugato, nusidažo mėlynai žalia spalva, pakeičiama į oranžinę, kurią po reakcijos sustabdymo sieros rūgštimi galima matyti 450 nm bangų ruože.

REAGENTAI

APRAŠYMAS, PARUOŠIMAS NAUDOTI IR REKOMENDUOJAMOS LAIKYMO SĄLYGOS

Taip pat žr. **Įspėjimai ir atsargumo priemonės**.



Visus komponentus reikia laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje, jei nenurodyta kitaip; tokiomis sąlygomis jie išlieka aktyvūs iki rinkinio tinkamumo naudoti datos.

COATED WELLS

1. Dengti šulinėliai

Viena plokštelė (7G79-09) arba penkios plokštelės (7G79-11), kuriuose yra po 96 mikrošulinėlius, dengtus ŽIV antigenais (nuo 0,02 iki 0,25 µg/mL) ir monokloniniais antikūnais (0,6 µg/mL).

Prieš išimdami iš maišelio palaukite, kol šulinėliai sušils iki kambario temperatūros (nuo 18 iki 30°C).

Nenaudojamus šulinėlius sudėkite į kartu tiekiamą uždromą maišelį ir laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje.

SAMPLE DIL

2. Mėginių skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 8 mL (7G79-09) arba 18 mL (7G79-11) žaliai rudos spalvos buferinio tirpalo, galvijų ir pelių baltymų, detergento ir saponino. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „ProClin® 300“.

CONJUGATE

3. Konjugatas

Vienas buteliukas (7G79-09) arba trys buteliukai (7G79-11), kuriuose yra 1,1 mL ŽIV antigenų (nuo 0,2 iki 1,8 µg/mL) ir monokloninių antikūnų (nuo 0,6 iki 2,5 µg/mL), konjuguotų su krienų peroksidaze ir išdžiovintų užšaldant. Praskiedus, kiekvieno butelio turinio užtenka ne daugiau nei dviem plokštelėms.

CONJUGATE DIL

4. Konjugato skiediklis

Vienas butelis (7G79-09) arba trys buteliai (7G79-11), kuriuose yra po 22 mL geltono tirpalo, kurį sudaro buferis, galvijų baltymai, saponinas ir detergantas; vieno butelio turinio užtenka praskiesti vieną butelį konjugato. Sudėtyje yra 0,1% konservanto „ProClin® 300“.

Kojugato skiedimas

Švelniai pastuksenkite konjugato buteliuku ant darbatalio, kad pašalintumėte visas medžiagas, prilipusias prie guminio kamštelio. Visą konjugato skiediklio butelio turinį supilkite į konjugato butelį, vėl uždenkite jį dangteliu ir atsargiai vartydami sumaišykite. Ne trumpiau nei 30 minučių leiskite rehidruotis, retkarčiais pamaišydami. Praskiestas konjugatas turi būti raudonos spalvos. Jeigu reikia, praskiestą konjugatą galima supilti atgal į plastikinius konjugato skiediklio butelius arba maišyti su juose esančiu praskiestu konjugatu.

Praskiestą konjugatą galima laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje ne ilgiau nei keturias savaites.

CONTROL 1 + ⚠

5. Antikūnų prieš ŽIV-1 teigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 1,7 mL išaktyvinto žmogaus serumo buferyje su galvijų baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL 2 + ⚠

6. Antikūnų prieš ŽIV-2 teigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 1,7 mL išaktyvinto žmogaus serumo buferyje su galvijų baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL p24 +

7. ŽIV-1 p24 teigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 1,7 mL p24 (rekombinacinio antigeno) buferyje su galvijų baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL - ⚠

8. Neigiama kontrolės medžiaga

Du buteliai, kuriuose yra po 2,5 mL normalaus žmogaus serumo, praskiesto galvijų baltymų buferiu. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

SUBSTRATE DIL

9. Substrato skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 35 mL bespalvio trinitratro citrato ir vandenilio peroksido tirpalo.

SUBSTRATE CONC

10. Substrato koncentratas



Vienas butelis, kuriame yra 35 mL 3,3', 5,5' tetrametilbenzidino (TMB) ir stabilizatorių oranžiniame tirpale.

Substrato tirpalas

Norėdami paruošti substrato tirpalą, į švarų stiklinį arba plastikinį indą įpilkite oranžinio substrato koncentrato ir į jį tokį pat kiekį bespalvio substrato skiediklio. **Svarbu laikytis šios įpylimo eilės tvarkos, o visos pipetės ir stikliniai indai, naudojami ruošti substrato tirpalą, turi būti švarūs.** Alternatyviai substrato tirpalą galima pagaminti supilant visą substrato skiediklio butelio turinį į substrato koncentrato butelį. Viename substrato tirpalo butelyje esančio reagento pakanka ne mažiau nei penkioms plokštelėms – žr. 1 lentelę.

1 Lentelė

Reikiamas substrato koncentrato ir substrato skiediklio kiekis

Šulinėlių skaičius	Plokštelių skaičius
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 96	1 2 3 4
Substrato koncentratas (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22
Substrato skiediklis (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22

Naudojant su automatinėmis sistemomis gali reikėti papildomo reagento. Saugoti nuo visų natūralios ir dirbtinės šviesos šaltinių. Substrato tirpalas turi būti gelsvas; jeigu prieš naudojimą jis yra žalias, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą.

Vietoj paruošto šio rinkinio substrato tirpalo galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio, kuriam naudojamas oranžinis substrato koncentratas, tirpalą. Užtikrinkite, kad substrato tirpalas būtų ruošiamas iš kartu pateikiamo substrato skiediklio ir substrato koncentrato.

Paruoštas substrato tirpalas, laikomas šaldytuve (nuo 2 iki 8°C temperatūroje) arba nuo 15 iki 25°C temperatūroje, išlieka stabilus ne daugiau nei dvi dienas, tačiau jį reikia išmesti, jeigu susidaro kristalų.

WASH FLUID

11. Plovimo skystis

Vienas butelis (7G79-09) arba du buteliai (7G79-11), kuriuose yra po 125 mL 20 kartų koncentruoto glicino/borato plovimo skysčio. Sudėtyje yra 0,2% konservanto Bronidox®.

Vieną dalį koncentruoto plovimo skysčio įpilkite į 19 dalių distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad gautumėte reikiamą tūrį, arba praskieskite visą vieno plovimo skysčio butelio turinį, kad gautumėte 2500 mL galutinio tirpalo. Plovimo skysčio koncentrate gali būti kristalų, tačiau šie kristalai ištirps, kai plovimo skystis bus praskiestas iki darbinio stiprumo. Praskiestame plovimo skystyje yra 0,01% konservanto Bronidox®.

Plovimo skystį iš šio rinkinio galima naudoti su glicino/borato plovimo skysčiu iš bet kurio kito „Murex“ rinkinio. Darbinio stiprumo plovimo skystį laikykite 18-30°C temperatūroje uždare inde. Tokiomis sąlygomis jis išliks aktyvus vieną mėnesį.

PASTABA. laikant, plovimo skystis gali pagelsti. Tai neturės įtakos tyrimo atlikimui, jeigu plovimo skystis bus visiškai išsiurbtas iš šulinėlių.

PASTABA. nors substrato tirpalas ir plovimo skystis yra keičiami, jų negalima naudoti pasibaigus galiojimo terminui, išspausdintam ant komponentų etiketės.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

IVD

Reagentai skirti tik *in vitro* diagnostikai.

Tik profesionaliam naudojimui.

Informaciją apie potencialiai pavojingus komponentus galite rasti gamintojo saugos duomenų lape ir gaminio žymėjime.

Rinkinio kontrolės medžiagose gali matytis fibrino nuosėdų; tai neturi įtakos preparato funkcionalumui. Jos iškremta, kai kontrolės medžiagoms gaminti naudojamas tam tikrų partijų serumas.

SVEIKATOS IR SAUGOS INFORMACIJA



ATSARGIAI. Šiame rinkinyje yra žmogaus kilmės komponentų.

Gamybai naudojamas žmogaus serumas buvo patikrintas ir nustatytas jo reagavimas arba nereagavimas su analitėmis, kaip nurodyta **2 lentelėje** toliau.

2 Lentelė

Komponentas	Reagavo su	Nereagavo su
Neigiama kontrolės medžiaga	Netaikytina	HBsAg, antikūnai prieš HCV, ŽIV-1 ir HIV-2
Teigiama kontrolės medžiaga 1	antikūnai prieš ŽIV-1	HBsAg
Teigiama kontrolės medžiaga 2	antikūnai prieš ŽIV-2	HBsAg

Be to, teigiamų kontrolės medžiagų gamybai naudojamas žmogaus serumas yra patikrintas dėl antikūnų prieš HCV ir gali būti reaktyvus.

Prieš naudojimą reagento ruošimui, visi naudojami reagavę serumo mėginiai buvo išaktyvinti. Nepaisant to, visas žmogaus kilmės medžiagas reikia laikyti potencialiai infekcinėmis ir su šiuo rinkiniu bei tiriamaisiais bandiniais reikia dirbti laikantis nustatytos geros laboratorinės praktikos.

Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) pavojingi reagentai klasifikuojami ir pažymėti taip:

Reagentai:	CONJUGATE	DIL	SAMPLE	DIL	CONJUGATE*
Klasifikacija:	Skin Sens. 1H317				
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas				
Simboliai / piktogramos:					
Pavojingumo frazės:	H317 gali sukelti alerginę odos reakciją.				
Atsargumo frazės:	P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P363 užterštus drabužius išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. P333+P313 jeigu sudirginama oda arba ją išberia: Kreiptis į gydytoją.				
Sudėtis:	Reakcijos masė: 5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (EB Nr. 247-500-7) ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas (EB Nr. 220-239-6) (3:1).				
* Praskiestame konjugate būna 0,1 % „ProCIn® 300“, kuri Reglamente (EB) Nr. 1272/2008 priskiriama pavojingoms medžiagoms.					

Reagentai:	SUBSTRATE	CONC
Klasifikacija:	Eye Irrit. 2 H319	
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas	
Simboliai / piktogramos:		
Pavojingumo frazės:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą	
Atsargumo frazės:	P264 po naudojimo kruopščiai nusiplauti rankas. P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.	

Remiantis Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) **WASH FLUID** pažymėtas fraze EUH210 (saugos duomenų lapus galima gauti paprašius).

Papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose, esančiuose interneto svetainėje www.diasorin.com

1. Potencialiai kontaminuotas medžiagas reikia šalinti saugiai pagal vietos reikalavimus.
2. Išsiliejus galimai pavojingoms medžiagoms, jas reikia nedelsiant surinkti absorbuojančio popieriaus audiniu, o užterštą vietą prieš tęsiant darbą reikia nuvalyti, pavyzdžiui, 1,0% natrio hipochloritu¹². Natrio hipochlorito negalima naudoti išsiliejus medžiagoms, kurių sudėtyje yra rūgšties, išsiliejimo vietos prieš tai sausai nenušluosčius. Išsiliejusioms medžiagoms valyti naudojamos priemonės, įskaitant pirštines, turi būti utilizuojamos kaip potencialiai biologiškai pavojingos atliekos. Neautoklavuokite medžiagų, kurių sudėtyje yra natrio hipochlorito.
3. Neutralizuotas rūgštis ir kitas skystas atliekas reikia nukenksminti pridendant pakankamą kiekį natrio hipochlorito, kad galutinė koncentracija būtų ne mažesnė nei 1,0%. Kad nukenksminimas būtų veiksmingas, gali prireikti palikti 1,0% natrio hipochlorito tirpalą 30 minučių.
4. Nepipetuokite burna. Naudodami mėginius ir atlikdami tyrimą dėvėkite vienkartinės pirštines ir akių apsaugą. Pabaigę, kruopščiai nusiplaukite rankas.
5. Jeigu kuris nors reagentas pateko ant odos arba į akis, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.
6. Stabdymo tirpalui reikalinga sieros rūgštis ir stiklinėms priemonėms plauti naudojama druskos rūgštis yra korozinės ir jas reikia naudoti atitinkamai atsargiai. Jeigu kuri nors iš jų pateko ant odos arba į akis, kruopščiai nuplaukite vandeniu.

ANALIZĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Pasibaigus nurodytam galiojimo terminui, reagentų nenaudokite. Reikia vengti mikrobiologinio reagentų užteršimo, nes tai gali sumažinti produkto tarnavimo laiką ir dėl to gauti rezultatai gali būti klaidingi.
2. Nekeiskite **Tyrimo Procedūros** ir nepakeiskite reagentų kitų gamintojų ar kitos partijos reagentais, nebent nurodyta, kad reagentas keičiamas. Netrumpinkite nurodytos inkubacijos trukmės.
3. Prieš naudojimą visus reagentus ir mėginius palaikykite 18-30°C temperatūroje. Iškart po naudojimo visus reagentus grąžinkite į vietą, kurioje yra rekomenduojama laikymo temperatūra.
4. Su reagentais naudojamas stiklines priemonės reikia kruopščiai išplauti 2M druskos rūgštimi ir po to išskalauti distiliuotu arba labai kokybišku dejonizuotu vandeniu.

5. Nelaikykite reagentų ir mėginių šaldikliuose su automatinio atitirpdymo funkcija.
6. Laikymo metu ar inkubacijos etape reagentų neveikite ryškia šviesa ar hipochlorito garais.
7. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.
8. Neužterškite vieno reagentų kitais. Naudoti su „Murex“ analizės substrato tirpalu paskirkite atskirą pipetę. Reikia skirti vieną pipetę naudoti su konjugatu.
9. Reagentų susimaišymo atveju dėl šio tyrimo mėginių skiediklio galima gauti klaidingai teigiamus antikūnų prieš hepatito B paviršiaus antigeną (anti-HBs) tyrimų rezultatus.
Jeigu „Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimas atliekamas kartu su anti-HBs tyrimu stacionaraus tipo analizatoriuje, validavimo procese užtikrinkite, kad nebūtų kryžminės kontaminacijos galimybių.
10. Nepalieskite ir neaptaškykite šulinėlio krašto konjugatu. Nepūskite skysčių iš mikropipetės; jeigu įmanoma, rekomenduojama naudoti reversinį pipetavimą.
11. Prieš nuskaitydami plokštelę patikrinkite, ar plokštelės dugnas yra švarus ir sausas, ir ar skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
12. Neužterškite mikrošulinėlių dulkėmis nuo vienkartinį pirštinių.
13. Visiškai automatinį procesorių naudojimas
 - i) Nebūtina naudoti plokštelių dangtelių ir sausai iššluostyti šulinėlių.
 - ii) Neleiskite sistemos skysčiams patekti į mėginius arba reagentus.
 - iii) Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimai visiškai automatizuotuose procesoriuose.
14. Užtikrinkite, kad tyrimas būtų atliekamas temperatūros ribose, nurodytose tyrimo protokole.
15. Nenaudokite CO₂ inkubatorių.
16. Nelaikykite stabdymo tirpalo sekliame inde ir po naudojimo nesupilkite jo atgal į atsargų butelį.
17. Atliekant tyrimo protokolą validavimą analizatoriams, reikia atmesti tyrimų medžiagų susimaišymo galimybę.

BANDINIŲ ĖMIMAS, TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

BANDINIŲ ĖMIMAS

Galima naudoti serumo, plazmos su EDTA arba plazmos citratu mėginius. Užtikrinkite, kad serumo mėginiai būtų visiškai sukrešę. Centrifuguodami iš mėginio pašalinkite visas matomas daleles. Jeigu mėginiai paruošti naudojant skystus antikoagulantus (pvz., plazma su citratu), reikia apsparstyti skiedimo poveikį.

BANDINIŲ TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

Mėginius laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje. Jeigu mėginių nereikia tirti per 72 valandas, juos reikia atskirti nuo krešulio arba ląstelių agregatų ir laikyti užšaldytus (-15°C arba žemesnėje temperatūroje). Venkite daugkartinių užšaldymo-atšildymo ciklų. Mėginius galima laikyti užšaldytus ne ilgiau kaip 3 mėnesius. Atšildę užtikrinkite, kad mėginiai prieš tyrimą būtų kruopščiai išmaišyti.

PROCEDŪRA

NEPATEIKTOS, TAČIAU REIKALINGOS MEDŽIAGOS

1. **Sustabdymo tirpalas (nuo 0,5M iki 2M sieros rūgštis)**, pvz., nuo 3 mL (0,5M tirpalui) iki 11 mL (2,0M tirpalui) laboratorinės paskirties koncentruotos sieros rūgšties (18M) įpilkite į maždaug 80 mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens, po to papildykite vandens iki 100 mL bendrojo tūrio. Alternatyviai galima naudoti šį reagentą: 1N sieros rūgštis (kodas N0164, 15 flakonų pakuotė, ir N0165, 1 flakono pakuotė).
2. Plovimo skysčiui praskiesti, stabdymo tirpalui paruošti ir naudoti kartu su automatinėmis plovyklėmis reikia **šviežio distiliuoto arba aukštos kokybės dejonizuoto vandens**.
3. Atitinkamo tūrio **mikropipetės ir daugiakanalės mikropipetės**.
4. **Inkubatorius**, galintis palaikyti tyrimo protokole nurodyto diapazono temperatūrą.
5. **Forminis šildymo blokas** (kodas 5F09-02). Skirtas naudoti laboratorijos inkubatoriuose. Geriausia forminį šildymo bloką laikyti naudojamame inkubatoriuje. Jeigu tai neįmanoma, jį reikia įdėti į inkubatorių ne mažiau nei keturias valandas iki tyrimo pradžios.
6. **Instrumentai**
 - a) Automatinė mikroplokštelių juostų plovyklė,
 - b) Mikroplokštelių skaitytuvas arba
 - c) Visiškai automatinis mikroplokštelių procesorius.

Prieš naudojimą reikia patikrinti visų instrumentų tinkamumą naudoti.

Išsamios informacijos apie rekomenduojamas instrumentų ir tinkamumo įvertinimo procedūrų sistemas ir programinės įrangos protokolus kreipkitės į vietos atstovybę.
7. **Vienkartiniai reagentų lovėliai**. (Kodas 5F24-01).
8. **Natrio hipochloritas** dekontaminacijai. (Žr. skyrių **Sveikatos ir saugos informacija**).
9. **Natrio hidroksido tirpalas** (0,1M). (Instrumentų dekontaminacijai).

TYRIMO PROCEDŪRA

Prieš atlikdami tyrimą atidžiai perskaitykite skyrių **Analizės atsargumo priemonės**.

Įvairių tyrimo komponentų įpylimą į šulinėlius galima patvirtinti plika akimi patikrinant plokštelę, ar spalvos yra kaip nurodyta:

Mėginių skiediklis yra žaliai rudos spalvos. Pridėjus mėginio arba kontrolės medžiagos, spalva pasikeis į mėlynai žalią. Skirtingų mėginių spalvos kis įvairiai, tačiau visada turi būti matomas pokytis. Mėginio arba kontrolės medžiagos įpylimą galima patvirtinti mikroplokštelių skaitytuvu 570 nm arba 620 nm bangų ruože, kai referencinis bangų ruožas yra 690 nm.

Praskiestas konjugatas yra raudonos spalvos. Konjugato įpylimą galima patvirtinti mikroplokštelių skaitytuvu 490 nm bangų ruože, kai referencinis bangų ruožas yra 690 nm.

Substrato tirpalas iš pradžių yra gelsvas, o reaguojančiuose šulinėliuose tampa mėlynai žalias. Pridėjus stabdymo tirpalo, mėlynai žalia reaguojančių šulinėlių spalva pakinta į oranžinę, o nereaguojančių šulinėlių – į rožinę. Substrato tirpalų įpylimą galima patvirtinti mikroplokštelių skaitytuvu 450 nm bangų ruože (referencijos nėra).

PUSIAUS AUTOMATINIS APDOROJIMAS

1 veiksmas	Praskieskite ir sumaišykite konjugatą , paruoškite substrato tirpalą ir plovimo skystį .	
2 veiksmas	Naudokite tik tyrimui būtiną šulinėlių kiekį . Stenkitės neprisiliesti prie šulinėlių viršaus arba dugno.	
3 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 25 µL mėginių skiediklio .	25 µL
4 veiksmas	Į šulinėlius įpilkite 100 µL mėginio arba 100 µL kontrolės medžiagos . Kiekvienos plokštelės pirmąjį šulinėlių stulpelį naudokite tyrimo kontrolės medžiagoms. Padalinę mėginius, kontrolės medžiagas įpilkite į tam skirtus šulinėlius. 100 µL neigiamos kontrolės medžiagos įlašinkite į kiekvieną iš trijų šulinėlių nuo A1 iki C1, o 100 µL p24, antikūnų prieš ŽIV-1 ir ŽIV-2 teigiamos kontrolės medžiagų į šulinėlius nuo D1 iki F1 (atitinkamai). Naudojant baltą foną bus lengviau matyti, kad mėginys įpiltas.	100 µL
5 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 60 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje	60 min
6 veiksmas	Baigusis inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite , kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros .	
7 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 100 µL substrato tirpalo	100 µL
8 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje.	30 min
9 veiksmas	Baigusis inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite , kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros .	
10 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL substrato tirpalo .	100 µL
11 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje. Saugokite nuo tiesioginės saulės šviesos. Šulinėliai, kuriose yra reaguojančių mėginių, nusidažys mėlynai žalia spalva.	30 min
12 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 50 µL sustabdymo tirpalo (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgšties).	50 µL
13 veiksmas	15 minučių laikotarpyje nuskaitykite absorbuojamąją gebą 450 nm bangose; jeigu yra, referencijai naudokite nuo 620 iki 690 nm ilgio bangas. Atlikite tuščiąjį matavimą instrumentu (be plokštelės laikiklyje).	A₄₅₀

PLOVIMO PROCEDŪROS

Vietos atstovybėje galite gauti plovyklių, kurias rekomenduojama naudoti, ir plovyklių bei analizatorių tikrinimo procedūrų protokolus. Rekomenduojama naudoti šį protokolą:

a. Automatinės mikroplokštelių juostų plovyklės protokolai

Atlikite 5 plovimo ciklus, naudodami darbinio stiprumo plovimo skystį. Jeigu įmanoma užtikrinkite, kad:

- i) Su „DiaSorin“ tiekiamais instrumentais būtų naudojama 500 µL/šulinėliui užpildymo tūrio plovimo srovė. Jeigu naudojami kiti instrumentai, su kuriais tai neįmanoma, užtikrinkite, kad šulinėlis būtų visiškai užpildytas.
- ii) Įpylimo aukštis nustatytas taip, kad užpildytų visą šulinėlį su nedideliu teigiamu paviršiaus išsipūtimu, bet nebūtų perpildos.
- iii) Vienam įsiurbimo/plovimo/mirkymo ciklui atlikti reikia maždaug 30 sekundžių.
- iv) Užtikrinkite, kad šulinėlyje neliktų skysčio (jeigu galima, pabaigos cikle atlikite du įsiurbimo veiksmus).
- v) Baigę plovimą, apverskite plokštelę ir nuvarvinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.

PASTABA. tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.

Baigus tyrimą, plovykles reikia išskalauti distiliuotu arba dejonizuotu vandeniu, kad neužsikimštų ir nevyktų korozija.

VISIŠKAI AUTOMATINIS MIKROPLOKŠTELIŲ PROCESORIUS

Išsamios informacijos apie šiuo metu esančius įvertinto tinkamumo protokolus, kreipkitės į vietos atstovybę. Su tais instrumentais, kurie neturi patvirtintų protokolų, rekomenduojama laikytis šių nurodymų:

1. Nesuprogramuokite trukmės mažesnės nei nurodyta procedūroje.
2. Kiekvienos inkubacijos 37°C temperatūroje trukmę galima suprogramuoti ne daugiau nei 5 minutes ilgesnį.
3. Užtikrinkite, kad būtų laikomasi visų **Analizės atsargumo priemonių**. Prieš naudojimą pagal vietoje nustatytas procedūras reikia išsamiai įvertinti sudarytų protokolų tinkamumą pagal šias gaires.

REZULTATAI

REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS

Skaičiuojant ir interpretuojant tyrimo rezultatus kiekvieną plokštelę reikia analizuoti atskirai.

Rezultatus skaičiuoti ir interpretuoti reikia naudojant patvirtintą programinę įrangą.

Neigiama kontrolės medžiaga

Apskaičiuokite vidutinę neigiamų kontrolės medžiagų absorbuojamąją gebą.

Pavyzdys:

1 šulinėlis	=	0,084
2 šulinėlis	=	0,086
3 šulinėlis	=	0,070
Iš viso	=	0,240

Neigiamos kontrolės medžiagos vidurkis = 0,240/3 = 0,080

Jeigu bent vieno iš neigiamos kontrolės šulinėlių absorbuojamoji geba daugiau nei 0,15 virš leistino visų trijų vidurkio, tą vertę atmeskite ir apskaičiuokite naują neigiamos kontrolės vidurkį pagal du likusius kartotinius.

Kirpinio vertė

Apskaičiuokite kirpinio vertę, prie neigiamos kontrolės kartotinių vidurkio pridėdami 0,150 (žr. pirmiau).

Neigiamos kontrolės vidurkis = 0,080
Kirpinio vertė = 0,080+0,150=0,230

KOKYBĖS KONTROLĖ

Tyrimo rezultatai yra galiojantys, jeigu atitinka šiuos kontrolės kriterijus:

Neigiama kontrolės medžiaga

Vidutinė absorbuojamoji geba yra mažesnė nei 0,15.

Teigiamos kontrolės medžiagos

Kiekvienos teigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba daugiau nei 0,8 vertės didesnė nei vidutinė neigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba.

Tyrimus, kurie neatitinka šių kriterijų, reikia pakartoti.

Nors tai mažai tikėtina, bet jeigu rezultatai pakartotinai neatitinka kokybės kontrolės kriterijų arba tikėtino tyrimo funkcionalumo, kreipkitės į vietos atstovybę.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Nereaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra mažesnė už kirpinio vertę laikomi šiam tyrimui neigiamais.

Reaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra lygi kirpinio vertei arba didesnė už ją laikomi pradiniai reagavusiais su tyrimu (žr. **Procedūros apribojimai**).

Tokius mėginius reikia pakartotinai iširti du kartus naudojant originalų šaltinį, jeigu vietos procedūros nenumato kitaip. Mėginiai, kurie reagavo bent viename iš dviejų pakartotinių tyrimų, laikomi kartotiniai reagavusiais su „Murex HIV Ag/Ab Combination“ ir daroma prielaida, kad juose yra reaguojančio ŽIV šerdies antigeno ir (arba) antikūnų prieš ŽIV-1 arba ŽIV-2. Tokius mėginius būtina iširti kitais būdais, o šio tyrimo rezultatus reikia nagrinėti su kita klinicine ir (arba) laboratorine informacija. Mėginiai, kurie abiejuose kartotinio tyrimo šulinėliuose nereagavo, nereaguojančiais su ŽIV šerdies antigenu ir ŽIV antikūnais.

Jeigu nepridėta mėginio

Šulinėlių, į kuriuos nepridėta mėginio, tačiau įpilta visų reagentų, absorbuojamosios gebos vertės gali būti žymiai aukštesnės nei neigiamos kontrolės medžiagos.

SPECIFINĖS TYRIMO FUNKCIONALUMO CHARAKTERISTIKOS

„Murex HIV Ag/Ab Combination“ funkcionalumas nustatytas tiriant mėginius, paimtus iš atsitiktinių kraujo donorų, AIDS sergančių pacientų (su diagnoze, nustatyta pagal CDC kriterijus), su AIDS susijusį kompleksą (angl. ARC) turinčių pacientų ir kitų pacientų, kuriems kitais tyrimais nustatyta antikūnų prieš ŽIV-1 (įskaitant O grupę), pacientų su patvirtinta ŽIV-2 infekcija ir ŽIV infekcijos arba kitų klinikinių kategorijų rizikos grupės pacientų. Be to, jo atlikimo efektyvumas buvo vertinamas naudojant rinkoje esančius serokonversijos panelius.

Diagnostikos jautrumas

Buvo iširti iš viso 497 bandiniai, apimti iš pacientų su patvirtinta ŽIV-1 infekcija ir nustatyta, kad jie reagavo su „Murex HIV Ag/Ab Combination“. Bandiniai buvo paimti iš įvairių stadijų ŽIV infekciją turinčių pacientų: 24 bandiniai, paimti iš pacientų, turinčių ŽIV-1 O potipio infekciją ir 139 bandiniai iš pacientų, užsikrėtusių ŽIV-1 ne B potipio virusais.

Be to, naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“ buvo iširta iš viso 100 bandinių, paimtų iš pacientų, kuriems patvirtinta ŽIV-2 infekcija ir buvo nustatyta, kad jie reaguoja.

Apskaičiuotasis „Murex HIV Ag/Ab Combination“ diagnostikos jautrumas šioje bandinių grupėje yra 100% (597/597), o binominio skirstinio apatinė 95% pasikliauties ribinė vertė yra 99,38% (593/597).

Naudojant tyrimą „Murex HIV Ag/Ab Combination“ iširtos iš viso 32 rinkoje esantys ŽIV 1 serokonversijos plokštės. Referenciniu kriterijumi laikant ir šerdies (p24) ir apvalkalo (gp120/160) juostos buvimą „Western blot“ tyrime, naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimu antikūnai prieš ŽIV visuose paneliuose aptikti anksčiau arba tame pačiame mėginyje, kaip naudojant „Western blot“ metodą.

Iš viso 68 ląstelių kultūrų supernatantai, infekuoti ŽIV 1 ir ŽIV 2, bei 80 ŽIV 1 antigenų atžvilgiu teigiamų bandinių iširti naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“ ir identifiukuoti teisingai.

Analizinis jautris

Jautris pagal AFSSAPS ŽIV Ag standartą

„Murex HIV Ag/Ab Combination“ jautrumas pagal AFSSAPS ŽIV Ag standartą nustatytas trijuose tyrimo centruose.

3 Lentelė
AFSSAPS ŽIV Ag standartas

Centras	Jautrumas ŽIV Ag pg/mL
1	31
2	28
3	25
Vidurkis	28

3 lentelėje pateikiami duomenys, gauti šių tyrimų metu, tačiau atliekant kitus tyrimus gali nepavykti jų tiksliai atkartoti.

Jautris tiriant pirmąjį tarptautinį referencinį ŽIV 1 p24 antigeną. NIBSC kodas 90/636

Pirmąjį tarptautinį referencinį ŽIV 1 p24 antigeno reagentą (NIBSC kodas 90/636) ištyrus naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“, nustatytas 0,977 IU/mL jautris.

Diagnostikos specifiškumas

Studijoje, kurios metu buvo tiriami Europos kraujo donorų populiacijos bandiniai, nustatytas $\geq 99,5\%$ „Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimo specifiškumas. Trijuose Europos kraujo perpylimo centruose buvo atliktas iš viso 9290 rutininių donorų bandinių skringingas naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimą. Rezultatų suvestinė pateikiama 3 lentelėje. Šioje studijoje 99,77% (9269/9290) mėginių nereagavo, o 0,23% (21/9290) reagavo pakartotinai. Vienas iš pakartotinai reagavusių bandinių buvo silpnai teigiamas į „Murex“ ŽIV antigeno mAb (8E77). Likusius 20 bandinių ištyrus dėl ŽIV-1 antigeno arba antikūno prieš ŽIV-1 arba ŽIV-2 buvimą, teigiamų rezultatų patvirtinta nebuvo.

Apskaičiuotasis „Murex HIV Ag/Ab Combination“ diagnostikos jautrumas tikėtinais neigiamų Europos kraujo donorų grupėje yra 99,78% (9269/9289), o binominio skirstinio apatinė 95% pasikliauties ribinė vertė yra nuo 99,67% (9258/9289) iki 99,87% (9277/9289).*

Naudojant „Murex HIV Ag/Ab Combination“ taip pat buvo iširti iš viso 272 bandiniai, paimti iš pacientų su sutrikimais, nesusijusiais su ŽIV infekcija. Šią grupę sudarė nėščiąjų bandiniai ir autoimunine liga bei kitomis ūminėmis virusinėmis infekcijomis sergančių pacientų bandiniai. Iš viso penki bandiniai reagavo su „Murex HIV Ag/Ab“, keturi reagavo su kitais rinkoje esančiais skringingo tyrimais. „Western blot“ studijoje keturių mėginių rezultatai buvo neapibrėžti, o vieno – neigiami.

Be to, buvo iširta 30 lipeminių, ikerinių ir hemolizuotų bandinių ir nustatyta, kad jie nereaguoja. Iširta 10 HAMA atžvilgiu teigiamų bandinių ir nustatyta, kad jie nereaguoja.

Bendras apskaičiuotasis „Murex HIV Ag/Ab Combination“ diagnostikos jautris patvirtintų neigiamų bandinių grupėje yra 99,78% (9 561/9 582), o binominio skirstinio apatinė 95% pasikliautinio intervalo ribinė vertė yra nuo 99,67% (9 550/9 582) iki 99,86% (9 568/9 582).*

*Pateikiami tipiniai funkcionalumo duomenys. Skirtingose laboratorijose gaunami kitų gyventojų grupių rezultatai gali skirtis.

4 Lentelė
„Murex HIV Ag/Ab Combination“ reagavimas su tikėtinais neigiamais rutininių Europos kraujo donorų bandiniais

Centras	Iširtų tikėtinais neigiamų donorų skaičius	Kartotiniai reagavusių bandinių skaičius
A	3095	6 ^a (0,19%)
B	2803	9 (0,32%)
C	3392	6 (0,18%)
IŠ VISO	9290	21 (0,23%)

^a Įskaitant vieną bandinį, kuris buvo silpnai teigiamas „Murex“ ŽIV antigeno mAb (8E77).

Analizinis savitumas

Kontroliuojamos su tyrimu „Murex HIV Ag/Ab Combination“ sąveikauti galinčių medžiagų studijos sąveikos neparodė, kai tirtų medžiagų koncentracija buvo, kaip nurodyta 5 lentelėje toliau.

5 Lentelė
Veiksmingumas tiriant galinčias sąveikauti medžiagas

Medžiaga (endogeninė)	Tirta koncentracija
Bendrasis baltymų kiekis – mažas	Sąveikos nenustatyta esant 50 g/L
Trigliceridai	Sąveikos nenustatyta esant 3 000 mg/dL
Vitaminas H (biotinas)	Sąveikos nenustatyta esant 3 500 ng/mL
Nekonjuotasis bilirubinas	Sąveikos nenustatyta esant 40 mg/dL
Konjuotasis bilirubinas	Sąveikos nenustatyta esant 40 mg/dL
Cholesterolis	Sąveikos nenustatyta esant 400 mg/dL

Medžiaga (egzogeninė)	Rezultatas
Adefoviras dipivoksilis	Sąveikos nenustatyta esant 10 mg/L
Entekaviras	Sąveikos nenustatyta esant 0,5 mg/L
Lamivudinas	Sąveikos nenustatyta esant 300 mg/L
Tenofoviras	Sąveikos nenustatyta esant 0,0978 mg/dL
Acetaminofenas	Sąveikos nenustatyta esant 15,6 mg/dL
Emtricitabinas	Sąveikos nenustatyta esant 0,9 mg/dL
Interferonas alfa 2a	Sąveikos nenustatyta esant 6 000 IU/mL
Interferonas alfa 2b	Sąveikos nenustatyta esant 6 000 IU/mL
Interferonas alfa 1b (INF alfa 1)	Sąveikos nenustatyta esant 6 000 IU/mL
Ibuprofenas	Sąveikos nenustatyta esant 21,9 mg/dL
Telbivudinas	Sąveikos nenustatyta esant 600 mg/L
Vitaminas C (L-askorbo rūgštis)	Sąveikos nenustatyta esant 300 mg/L
Sofosbuviras	Sąveikos nenustatyta esant 0,190 mg/dL

Tyrimo atkuriamumas

„Murex HIV Ag/Ab Combination“ tyrimo atkuriamumas buvo įvertintas ištyrus dvi tyrimo kontrolės medžiagas ir keturis kokybės užtikrinimo panelio komponentus kaip dešimt kartotinių keturiais atskirais atvejais. Tyrimo rezultatų suvestinė pateikiama 4 lentelėje.

6 Lentelė
„Murex HIV Ag/Ab Combination“ Tyrimo atkuriamumas

Bandinys	Tyrimų skaičius	Kartotinių skaičius	Vidutinė absorbuojamoji geba / kirpinio rodiklis	Atliekant vieną tyrimą, VK, %	Atliekant kelis tyrimus, VK %
Neigiama kontrolės medžiaga	4	10	0,266	8,7	11,3
ŽIV-1 teigiama kontrolės medžiaga	4	10	8,287	4,3	4,7
QA01	4	10	3,672	4,6	7,3
QA02	4	10	4,696	5,6	12,9
QA03	4	10	3,006	3,9	4,2
QA04	4	10	1,663	6,8	9,2

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Būtina laikytis skyriuose **Tyrimo procedūra ir Rezultatų interpretavimas** pateiktų nuorodų.
- Tyrimas buvo įvertintas tik naudojant atskirų individų (ne jungtinio) serumo, plazmos su EDTA arba plazmos su citratu mėginius.
- Neigiami antigeno/antikūno aptikimo tyrimo rezultatai neatmeta ŽIV infekcijos galimybes.
- Teigiamą „Murex HIV Ag/Ab Combination“ rezultatą reikia patvirtinti bent vienu kitu tyrimu.
- Teigiamus rezultatus, kurių neįmanoma pakartoti, galima gauti atliekant bet kurią EIA procedūrą. Dažniausi klaidų šaltiniai yra:
 - Netikslus mėginio, konjugato arba substrato įpylimas į šulinėlius.
 - Substrato užteršimas konjugatu.
 - Užteršimas konjugatais iš kitų tyrimų.
 - Užsikimšę arba iš dalies užsikimšę plovyklės zondai.
 - Nepakankamas įsiurbimas, dėl ko šulinėliuose liko nedidelis kiekis plovimo skysčio.
 - Prieš plokštelės nuskaitymą nepatikrinus, ar šulinėlių dugnas yra švarus bei sausas ir ar šulinėliuose esančio skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
 - Nuskaitymą atliekant netinkamo ilgio bangų ruože (450 nm) arba naudojant netinkamo ilgio referencines bangas (ne nuo 620 nm iki 690 nm).
- Naudojant labai hemolizuotus mėginius, ne visiškai sukrešėjusį serumą, plazmos mėginius su fibrinu arba mikrobiologiškai užterštus mėginius gali padaugėti klaidingų rezultatų.
- Mėginiams, kuriuose bendroji baltymų koncentracija didesnė už normalią fiziologinę koncentraciją, gali būti dažniau nustatyti klaidingi rezultatai.
- Šis tyrimas nebuvo įvertintas dėl galimybės naudoti tiriant lavonų mėginius.

Saugos ir veiksmingumo savybių santrauką galima gauti EUDAMED.

Tik ES: atkreipkite dėmesį, kad apie visus sunkius su šia IVD medicinos priemone susijusius incidentus reikia pranešti „DiaSorin Italia S.p.A.“ atstovybei JK ir ES valstybės narės, kurioje įsisteigęs naudotojas ir (arba) gyvena pacientas, kompetentingajai tarnybai.

LITERATŪRA

1. **Sharp PM** et al. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011 Sep;1(1).
2. **Becerra** et al. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. Microb Cell. 2016 Sep 05;3(9):451-475.
3. **Poorolajal J.** et al. Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. Public Health. 2016 Oct;139:3-12.
4. **Shaw G.M.** and Hunter E. HIV Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med 2012;2.
5. **Parekh BS.** et al. Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection. Clin Microbiol Rev. 2018 Nov 28;32(1).
6. **Pandey D.** et al. HIV Infection: A Review of Their Inhibitors Progression. Biomed Pharmacol J 2017;10(2).
7. **Buttò S.** et al. Laboratory diagnostics for HIV infection. Ann Ist Super Sanita. 2010;46(1):24-33.
8. **Bangalee A.** et al. Evaluation of serological assays for the diagnosis of HIV infection in adults. S Afr Fam Pract (2004). 2021 Oct 25;63(1):e1-e5.
9. **Dwyre DM.** et al. Hepatitis B, hepatitis C and HIV transfusion-transmitted infections in the 21st century. Vox Sang. 2011 Jan;100 (1):92-8.
10. **Salles NA.** Detection of HIV-1 infections in blood donors during the pre-seroconversion window period in São Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2019 May 16;52.
11. **WHO.** (2017) Blood safety and availability. Fact sheet.
12. **Centres for Disease Control.** (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox[®] ir ProClin[®] nėra bendrovės DiaSorin prekių ženklai.



DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123



DiaSorin Italia S.p.A.
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

F01DS41LT

2023 m. rugpjūčio mėn.



The Diagnostic Specialist

en

REF 9E25-01 / 02
GE94/95

Revised September, 2014

Murex HIV-1.2.0

2.2. Reagentai yra skirti ŽIV1/2 antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Rinkiniai po 96 testus. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms sunaudojami 5 šulinėliai.

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 (HIV-1, HIV-1 group O) and 2 (HIV-2) in human serum or plasma

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of antibodies to HIV-1, including group O, and HIV-2 or as an aid to the diagnosis of HIV infection.

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

This instructions for use must be read carefully prior to use. The instructions for use must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions for use.

IVD

Key to symbols used			
	List Number		<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	Lot Number		Store at 2-8°C
	Expiration Date		CAUTION: Consult accompanying documents
	Manufacturer		Consult instructions for use

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.

2.2. Reagentai yra skirti ŽIV1/2 antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Rinkiniai po 96 testus. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms sunaudojami 5 šulinėliai.

INTENDED USE

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 (HIV-1, HIV-1 group O) and 2 (HIV-2) in human serum or plasma.

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of antibodies to HIV-1, including group O, and HIV-2 or as an aid to the diagnosis of HIV infection.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Two types of human immunodeficiency virus, HIV-1 and HIV-2, have been described and implicated as causative of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). Both are retroviruses which are transmitted by exposure to certain infected body fluids, primarily blood and genital secretions, and by transplacental passage. Infection by HIV-1 has been reported worldwide; HIV-2 infection has been reported as occurring mainly in West Africa and some European countries¹. The two types of virus show substantial antigenic cross reactivity in their core proteins, but the envelope glycoproteins are less cross reactive. It is necessary for screening purposes to use epitopes from the envelope proteins of both viruses in addition to the major cross reacting core proteins to ensure detection of antibodies against both types of virus at all stages following infection². Variants of HIV-1, classified together as group O, have been identified in samples from Cameroon and Europe^{3,4}. Group O is highly divergent from the originally known subtypes of HIV-1 (together classified as group M). Specific epitopes from the envelope region of this virus can be used to detect antibody to group O in infected individuals; reliance on cross reactions to the known subtypes of HIV is not satisfactory⁵. The earliest specific antibody response following infection by HIV may be of immunoglobulin M (IgM) followed by a response in immunoglobulin G (IgG)⁶. Maximum sensitivity for detection of anti-HIV seroconversion is achieved by assays which respond to both IgM and IgG.

Murex HIV-1.2.O is expected to detect IgG and IgM and additionally IgA to the envelope glycoproteins and the cross-reacting core proteins of HIV-1 and HIV-2. Consequently potentially infectious samples of serum, EDTA plasma or citrate plasma can be identified.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Murex HIV-1.2.O is based on microwells coated with a synthetic peptide representing an immunodominant region of HIV-1 (O), recombinant protein derived from the envelope proteins of HIV-1 and HIV-2 and an HIV core protein. The Conjugate is a mixture of the same epitopes all labelled with horseradish peroxidase.

Test specimens and control sera are incubated in the wells and antibodies to HIV in the sample or control sera bind to the antigens on the microwell; sample and any excess antibodies are then washed away. In a subsequent step, Conjugate is added which in turn binds to any specific antibody already bound to the antigen on the well. Samples not containing specific antibody will not cause the Conjugate to bind to the well. Unbound Conjugate is washed away and a solution containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added to the wells. Wells with bound Conjugate develop a purple colour which is converted to an orange colour when the reaction is stopped with sulphuric acid. After incubation the enzymic reactions are terminated with sulphuric acid and the colour is read spectrophotometrically at 450 nm. The amount of Conjugate, and hence colour, in the wells is directly related to the concentration of antibody to HIV in the sample.

REAGENTS

DESCRIPTION, PREPARATION FOR USE AND RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS

See also **Warnings and Precautions**



All components must be stored at 2 to 8°C, unless otherwise stated, under which condition they will retain activity until the expiry date of the kit.

COATED WELLS

1. Coated Wells

One plate (9E25-01) or five plates (9E25-02) of 96 microwells coated with HIV antigens.

If less than the whole plate is being used allow the wells to reach room temperature (18 to 30°C) before removal from the bag. Place unused wells in the sealable storage bag provided and return to 2 to 8°C.

SAMPLE DIL

2. Sample Diluent

One bottle containing 36 ml of a green/brown buffer solution and detergents. Contains 0.05% ProClin® preservative.

CONJUGATE

3. Conjugate

One bottle (9E25-01) or two bottles (9E25-02) containing a red freeze dried pellet of HIV antigen Conjugated to HRP. When reconstituted each bottle is sufficient for up to three plates.

CONJUGATE DIL

4. Conjugate Diluent

One bottle (9E25-01) or two bottles (9E25-02) each containing 18 ml of a yellow solution consisting of buffer, bovine protein and detergent. Contains 0.1% ProClin® preservative.

Reconstitution of Conjugate

Tap the bottle of Conjugate gently on the bench to remove any material adhering to the rubber stopper. Pour the whole contents of a bottle of conjugate diluent into a bottle of conjugate, recap the latter and mix by gentle inversion. Allow to rehydrate for at least 30 minutes with occasional swirling. The reconstituted conjugate will be red in colour.

After reconstitution the Conjugate may be stored at 2 to 8°C for up to eight weeks or at -15°C or colder for up to four weeks with up to four freeze/thaw cycles.

CONTROL 1 + !

5. Anti-HIV-1 Positive Control Serum

One bottle containing 1.7 ml of inactivated human serum in a buffer containing protein. Contains 0.05% Bronidox® preservative.

CONTROL 2 + !

6. Anti-HIV-2 Positive Control Serum

One bottle containing 1.7 ml of inactivated human serum in a buffer containing protein. Contains 0.05% Bronidox® preservative.

CONTROL - !

7. Negative Control

One bottle containing 2.5 ml of normal human serum diluted in a bovine protein buffer. Contains 0.05% Bronidox® preservative.

SUBSTRATE DIL

8. Substrate Diluent

One bottle containing 35 ml of a colourless solution of tri-sodium citrate and hydrogen peroxide.

SUBSTRATE	CONC
-----------	------

9. Substrate Concentrate

One bottle containing 35 ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and stabilisers in a pink solution.

Substrate Solution

To prepare the Substrate Solution add a volume of colourless Substrate Diluent to an equal volume of pink Substrate Concentrate in either a clean glass or plastic vessel. **It is important that this order of addition is followed and that any pipettes and glassware used to prepare Substrate Solution are clean.**

Alternatively, the Substrate Solution may be made by pouring the entire contents of the bottle of Substrate Diluent into the bottle of Substrate Concentrate.

Table 1
Volume of Substrate Concentrate and Substrate Diluent Required

Number of Wells										N° of Plates				
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	96	1	2	3	4
Substrate Concentrate (ml)														
0.5	1.0	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	6.0	6	12	18	22
Substrate Diluent (ml)														
0.5	1.0	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	6.0	6	12	18	22

Additional reagent may be required for use with automated systems. Keep away from sunlight. The Substrate Solution should be pink; if it is purple before being used it should be discarded and fresh Substrate Solution prepared.

The prepared Substrate Solution from this kit may be used interchangeably with that from all other Murex kits which use pink coloured Substrate Concentrate. Ensure that the Substrate Solution is prepared from the Substrate Diluent and Substrate Concentrate provided together.

The prepared Substrate Solution is stable refrigerated (2 to 8°C) or at 15 to 25°C for up to two days but must be discarded if crystals have formed.

WASH	FLUID
------	-------

10. Wash Fluid

One or two bottles containing 125 ml of 20 times working strength Glycine/Borate Wash Fluid. Contains 0.2% Bronidox® preservative.

Add one volume of Wash Fluid Concentrate to 19 volumes of distilled or deionised water to give the required volume or dilute the entire contents of one bottle of Wash Fluid to a final volume of 2500 ml. Crystals may be observed in the Wash Fluid Concentrate but these crystals will dissolve when the Wash Fluid is diluted to working strength. When diluted the Wash Fluid contains 0.01% Bronidox® preservative.

The Wash Fluid from this kit may be used interchangeably with Glycine/Borate Wash Fluid from any other Murex kit.

Store the working strength Wash Fluid at 18 to 30°C in a closed vessel under which conditions it will retain activity for one month.

NOTE: The Wash Fluid may develop a yellow colour on storage. This will have no effect on the performance of the assay providing the Wash Fluid is fully aspirated from the wells.

NOTE: Although the Substrate Solution and Wash Fluid are interchangeable, they must not be used beyond the expiry date printed on the component labels.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

IVD

The reagents are for *in vitro* diagnostic use only.

For professional use only.

Please refer to the manufacturer's safety data sheet and the product labelling for information on potentially hazardous components.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION



CAUTION: This kit contains components of human origin.

The human sera used for the manufacture have been screened and found reactive or non-reactive for analytes as shown in **Table 2** below.

Table 2

Component	Reactive for	Non-reactive for
Negative Control	N/A	HBsAg, Antibodies to HIV (types 1 and 2), HCV and HTLV
Positive Control 1	Antibodies to HIV-1	HBsAg
Positive Control 2	Antibodies to HIV-2	HBsAg

Additionally human sera used for positive controls are also tested for antibodies to HCV and may be reactive.

All reactive serum used has been inactivated prior to use in reagent preparation. However, all material of human origin should be considered as potentially infectious and it is recommended that this kit and test specimens be handled using established good laboratory practice.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP) hazardous reagents are classified and labeled as follows:

Reagents:	CONJUGATE DIL	SAMPLE DIL	CONJUGATE *
Classification:	Skin sens. 1 H317		
Signal Word:	Warning		
Symbols / Pictograms:			
Hazard Statements:	H317 May cause an allergic skin reaction		
Precautionary Statements:	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P363 Wash contaminated clothing before reuse. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice / attention		
Contains:	Reaction mass of: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazol-3-one [EC no. 247-500-7] and 2-methyl-2H-isothiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1).		
* The reconstituted Conjugate contains 0.1% ProClin® 300 which is classified hazardous per EC Regulation 1272/2008			

Reagents:	SUBSTRATE CONC
Classification:	Eye Irrit. 2 H319
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H319 Causes serious eye irritation
Precautionary Statements:	P264 Wash hands thoroughly after handling P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP), WASH FLUID is labeled as EUH210, safety data sheets available on request.

For additional information see Safety Data Sheets available on www.diasorin.com

- Potentially contaminated materials should be disposed of safely according to local requirements.
- Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued⁷. Sodium hypochlorite should not be used on acid containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
- Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
- Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- The following reagents contain low concentrations of harmful or irritant substances:
 - The Conjugate Diluent and Sample Diluent contain ProClin® 300 which can be absorbed through the skin and is a sensitising agent.
- Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If either come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
- If any of the reagents come into contact with the skin or eyes wash the area extensively with water.

ANALYTICAL PRECAUTIONS

- Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
- Do not modify the **Test Procedure** or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
- Allow all reagents and samples to come to 18 to 30°C before use. Immediately after use return reagents to the recommended storage temperature.
- Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionised water.
- Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of reagents and samples.
- Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
- Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
- Do not cross-contaminate reagents. Dedicate a pipette for use with the Substrate Solution of Murex assays. A pipette should also be dedicated for use with the Conjugate.
- Do not touch or splash the rim of the well with Conjugate. Do not blow out from micropipettes; reverse pipetting is recommended whenever possible.

- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
- Do not contaminate microwells with dust from disposable gloves.
- When using fully automated processors
 - It is not necessary to use plate lids and to tap dry the wells.
 - Do not allow system fluids from fully automated microplate processors to contaminate the samples or reagents.
 - The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assays on fully automated processors.
- Ensure the assay is run within the temperature limits defined in the assay protocol.
- Do not use CO₂ Incubators.
- Do not store the Stop Solution in a shallow dish or return it to a stock bottle after use.
- The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assay protocols on instrumentation.

SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

SPECIMEN COLLECTION

Serum, EDTA plasma or citrate plasma samples may be used. Ensure that the serum samples are fully clotted. Remove any visible particulate matter from the sample by centrifugation. If samples are prepared using liquid anti-coagulants e.g. citrate plasma, the dilution effect should be considered.

SPECIMEN TRANSPORT AND STORAGE

Store the samples at 2 to 8°C. Samples not required for assay within 7 days should be removed from the clot or cell pellet and stored frozen (-15°C or colder). Avoid multiple freeze-thaw cycles. After thawing ensure samples are thoroughly mixed before testing.

PROCEDURE

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid)**. e.g add between 3 ml (for 0.5M) and 11 ml (for 2.0M) of analytical grade concentrated sulphuric acid (18.0M) to about 80 ml of distilled or deionised water and then make up to 100 ml with more water. Alternatively, the following reagent can be used: 1N Sulphuric Acid (Code N0164 - 15 vial pack and N0165 - 1 vial pack).
- Freshly distilled or high quality deionized water** is required for dilution of Wash Fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
- Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
- Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
- Moulded Heating Block** (Code 5F09-02). For use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
- Instrumentation**
 - Automated microplate strip washer.
 - Microplate reader.
or
 - Fully automated microplate processor.
All instruments must be validated before use. Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
- Disposable Reagent Troughs**. (Code 5F24-01).
- Sodium hypochlorite** for decontamination (Refer to **Health and Safety Information**).
- Sodium hydroxide solution** (0.1M) (for instrument decontamination)

2.2. Reagentai yra skirti ŽIV1/2 antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Rinkiniai po 96 testus. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms sunaudojami 5 šulinėliai.

TEST PROCEDURE

Please read **Analytical Precautions** carefully before performing the test.

Addition of the various components of the assay to the wells may be confirmed visually by examining the plate for the following colours.

Sample Diluent is green/brown in colour. On addition of Sample or Control the colour will change to blue/green. The colour change will vary from sample to sample but some change should always be visible.

Reconstituted Conjugate is red in colour.

Substrate Solution is initially pink with any reactive wells becoming purple. On addition of Stop Solution the purple colour of the reactives will change to orange, whilst the negatives remain pink.

The addition of sample or reagent can be confirmed using a microplate reader as follows: Sample Diluent plus Sample read at 570 or 620 nm with a reference at 690 nm, Conjugate at 490 nm with a reference at 690 nm, Substrate Solutions at 490 nm (no reference).

Wells containing Sample Diluent may be left for up to 30 minutes at 18 to 30°C prior to addition of Sample, and for up to 15 minutes after the addition of Sample and Controls before starting **Step 5**

SEMI AUTOMATED PROCESSING

Step 1	Reconstitute and mix the Conjugate , prepare the Substrate Solution and Wash Fluid .	
Step 2	Use only the number of wells required for the test. Avoid touching the tops or bottoms of the wells.	
Step 3	Add 50 µl of Sample Diluent to each well.	50 µl
Step 4	Add 50 µl of Samples or 50 µl Controls to the wells. For each plate use the first column of wells for the assay Controls. Add the Controls to the designated wells after dispensing the samples. Pipette 50 µl of the Negative Control into each of three wells A1 to C1 and 50 µl of the anti-HIV-1 and HIV-2 Positive Controls into wells D1 and E1 respectively. Use of a white background will aid visualisation of sample addition.	50 µl
Step 5	Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 mins
Step 6	At the end of the incubation time wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 7	Immediately after washing the plate, add 50 µl of Conjugate to each well.	50 µl
Step 8	Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 mins
Step 9	At the end of the incubation time wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 10	Immediately after washing the plate, add 100 µl of Substrate Solution to each well.	100 µl
Step 11	Cover the wells with a lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C. Keep away from direct sunlight. A purple colour should develop in wells containing reactive samples.	30 mins
Step 12	Add 50 µl of Stop Solution (0.5M to 2M sulphuric acid) to each well.	50 µl
Step 13	Within 15 minutes read the absorbance at 450 nm using 620 nm to 690 nm as the reference wavelength if available. Blank the instrument on air (no plate in the carriage).	A ₄₅₀

WASH PROCEDURES

Protocols for recommended washers and procedures for verifying washers and analysers can be obtained from your representative. The following protocol is recommended:

a) Protocol for automated microplate stripwasher.

Perform 5 wash cycles using working strength Wash Fluid. Ensure, where possible, that:

- (i) Flow-through washing with a fill volume of 500 µl/well is used with instrumentation supplied by DiaSorin. When using other instrumentation for which this is not possible, ensure that the well is completely filled.

- (ii) The dispense height is set to completely fill the well with a slight positive meniscus, without causing an overflow.
- (iii) The time taken to complete one aspirate/wash/soak cycle is approximately 30 seconds.
- (iv) Ensure that no liquid is left in the well (by use of a double aspirate step in the final cycle where possible).
- (v) After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbent paper.

NOTE: Do not allow the wells to become dry during the assay procedure.

Washers must be rinsed with distilled water at the end of the test to avoid blockage and corrosion.

FULLY AUTOMATED MICROPLATE PROCESSORS

Contact your representative for details of currently available validated protocols. For instrumentation without established validated protocols, the following guidelines are recommended.

1. Do not programme times shorter than specified in the procedure.
2. Incubation times between 30 and 35 minutes (32.5 ± 2.5 minutes) may be programmed.
3. Wells containing Sample Diluent may be left for up to 30 minutes at 18 to 30°C prior to addition of Sample, and for up to 15 minutes after the addition of Sample and Controls before starting **Step 5**.
4. Ensure all **Analytical Precautions** are followed.
Protocols written following these guidelines must be fully validated prior to use according to local procedures.

RESULTS

CALCULATION OF RESULTS

Each plate must be considered separately when calculating and interpreting results of the assay.

Approved software may be used for calculation and interpretation of results.

Negative Control

Calculate the mean absorbance of the Negative Controls.

Example:

Well 1	=	0.084	, Well 2 =	0.086	, Well 3 =	0.070
Total	=	0.240				
Mean Negative Control	=	0.240/3				
	=	0.080				

If one of the Negative Control Wells has an absorbance more than 0.15 O.D. above the mean of all three, discard that value and calculate the new Negative Control mean from two remaining replicates.

Cut-off value

Calculate the Cut-off value by adding 0.2 to the mean of the Negative Control replicates (see above).

Mean Negative Control	=	0.080				
Cut-Off Value	=	0.080	+	0.200	=	0.280

QUALITY CONTROL

Results of an assay are valid if the following criteria for the controls are met:

Negative Control

The mean absorbance must be less than 0.3.

Positive Control

The absorbance of each of the Positive Controls should be more than 0.8 above the mean absorbance of the Negative Control. Assays which do not meet these criteria should be repeated.

In the unlikely event of the results repeatedly failing to meet either the Quality Control criteria or the expected performance of the test, please contact your representative.

INTERPRETATION OF RESULTS

Non-reactive Results

Samples giving an absorbance less than the Cut-off value are considered negative in the assay.

Reactive Results

Samples giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off value are considered initially reactive in the assay (see **Limitations of the Procedure**).

Such samples should be retested in duplicate using the original source. Samples that are reactive in at least one of the duplicate retests are considered repeatedly reactive in Murex HIV-1.2.O and are presumed to contain antibodies to HIV-1 or HIV-2. Such samples should be further investigated and the presence of antibodies against HIV confirmed by other tests. Samples that are non-reactive i.e. with an absorbance less than that of the Cut-off value, should be considered non-reactive for HIV antibodies.

No sample addition

Absorbance values significantly higher than the Negative Control may be obtained in wells where the sample has been omitted but all the reagents have been added.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Murex HIV-1.2.O has been determined by testing samples from routine blood donors, patients with AIDS diagnosed according to CDC criteria, patients with AIDS Related Complex (ARC), other patients with known antibody to HIV-1 (including group O), patients with confirmed HIV-2 infection and patients at risk of HIV infection or in other clinical categories. In addition, its performance on commercially available seroconversion panels has been evaluated.

1. Donor Samples

The Murex HIV-1.2.O assay demonstrated a specificity of $\geq 99.5\%$ in a study where a total of 8,225 routine donor samples were screened with Murex HIV-1.2.O at four blood transfusion centres. In the study, 99.91% (8218/8225) of samples were non-reactive and 0.09% (7/8225) were repeatedly reactive. None of the repeatedly reactive samples were confirmed as positive for the presence of antibody to HIV-1 or HIV-2.

The specificity of Murex HIV-1.2.O on presumed negative samples from European donors is estimated to be 99.91% (8218/8225) with a 95% confidence interval of 99.82% (8211/8225) to 99.97% (8223/8225) by the binomial distribution.*

2. Clinical Samples

A total of 1,895 specimens were tested with Murex HIV-1.2.O. The samples were collected at a number of European retrovirology laboratories and included:

- 1,455 samples where antibody was demonstrated by alternative format enzyme immunoassays and/or Western blot. The samples comprised 1,254 samples from patients at various stages of HIV-1 infection (including 58 samples believed to be from patients with group O infection) and 201 samples from patients infected with HIV-2.
- 440 samples from patients with other diseases unrelated to HIV.

In this limited study, Murex HIV-1.2.O detected antibody to HIV in all 1,455 samples in group a) and none of the 440 samples in group b). The relative sensitivity of Murex HIV-1.2.O on these populations of samples was 100% (1455/1455) with a 95% confidence interval of 99.75% (1451/1455) to 100% by the binomial distribution.

A total of 18 HIV-1 seroconversion panels were tested with Murex HIV-1.2.O. Using the presence of both core (p24) and an envelope (gp120/160) band on Western blot as the reference criteria, Murex HIV-1.2.O detected antibody to HIV earlier or in the same sample as Western blot in all of the panels.

3. Assay Reproducibility

The intra-lot and inter-lot reproducibility of Murex HIV-1.2.O has been evaluated, using the assay controls and quality control panel members, at three laboratories. The results of the study are summarised in Table 3 and Table 4.

*Representative performance data are shown: results obtained at individual laboratories and with different populations may vary.

Table 3

Murex HIV-1.2.O - Intra-lot Assay Reproducibility (Mean Absorbance and Coefficient of Variation)

Centre	Kit Negative Control	Kit HIV-1 Positive Control	Kit HIV-2 Positive Control	QC1362	QC1366
Site 1	0.157 (CV 17.5%)	1.465 (CV 17.3%)	1.399 (CV 17.1%)	0.987 (CV 19.9%)	1.300 (CV 23.4%)
Site 2	0.115 (CV 6.7%)	1.372 (CV 9.7%)	1.344 (CV 13.4%)	0.934 (CV 15.3%)	1.240 (CV 14.7%)
Site 3	0.125 (CV 6.8%)	1.203 (CV 5.2%)	1.069 (CV 6.3%)	0.902 (CV 6.3%)	0.971 (CV 7.0%)

Table 4
Murex HIV-1.2.O - Inter-lot Assay Reproducibility

	QC1362	QC1363	QC1364	QC1376
Mean	0.79	0.55	0.73	0.22
CV	10.1%	8.8%	11.7%	5.0%

LIMITATIONS OF PROCEDURE

- The **Test Procedure** and **Interpretation of Results** must be followed.
- This test has only been evaluated for use with individual (unpooled) serum, EDTA plasma or citrate plasma samples. Murex HIV-1.2.O has not been evaluated for any other purpose.
- A negative result with an antibody detection test does not preclude the possibility of infection.
- Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.
- The most common sources of error are:
 - Imprecise delivery of Sample, Conjugate or Substrate into the wells.
 - Contamination of Substrate with Conjugate.
 - Contamination with conjugates from other assays.
 - Blocked or partially blocked washer probes.
 - Insufficient aspiration leaving a small volume of Wash Fluid in the wells.
 - Failure to ensure that the bottom surface of the wells is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before a plate is read.
 - Failure to read at the correct wavelength or use of an incorrect reference wavelength.
- A specimen collected in citrate may give a raised absorbance.
- The use of highly haemolysed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
- This test has not been evaluated for use with samples from cadavers.

BIBLIOGRAPHY

- Clavel, F. (1987). HIV-2: the West African Aids virus. *AIDS*, **1**, 135.
- Denis, F., Leonard, G., et al., (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 1000.
- Vanden Haesevelde, M., Decourt, J., et al., (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* **68**, 1586.
- Gürtler, L.G., Hauser, P.H., et al., (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68**, 1581.
- Loussert-Ajaka, I., Ly, T.D., et al., (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV subtype O infected patients. *Lancet*, **343**, 1393.
- Gains, H., von Sydons, H., et al., (1988). Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS*, **2**, 11.
- Centres for Disease Control. (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox® and ProClin® are not trade marks of DiaSorin.



DiaSorin S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

D11DS94GB
September, 2014

Peržiūrėta 2014 m.
rugsėjo mėn.

Murex HIV-1.2.0

Imunofermentinis tyrimas, skirtas aptikti antikūnus prieš 1 tipo (ŽIV-1, ŽIV-1 O grupės) ir 2 tipo (ŽIV-2) žmogaus imunodeficito virusą žmogaus serume arba plazmoje.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į antikūnų prieš ŽIV 1, įskaitant O grupę, ir ŽIV 2 buvimą arba kaip ŽIV infekcijos diagnostikos priemonę.

Klientų aptarnavimas

Dėl papildomos informacijos apie produktą susisiekite su vietos klientų aptarnavimo organizacija.

Prieš naudojimą reikia atidžiai perskaityti šias naudojimo instrukcijas. Būtina rūpestingai laikytis naudojimo instrukcijų. Esant nukrypimų nuo naudojimo instrukcijų, tyrimo rezultatų patikimumo garantuoti negalima.

IVD

Pagrindiniai naudojami simboliai

	Sąrašo numeris		<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas
	Serijos numeris		Laikyti 2-8°C temperatūroje
	Galiojimo terminas		ATSARGIAI. Žr. pridėtus dokumentus
	Gamintojas		Žr. naudojimo instrukcijas

Reagento komponentų pavadinimuose naudojamų simbolių išsamų paaiškinimą galite rasti skyriuje **REAGENTAI**.

PASKIRTIS

Imunofermeninis tyrimas, skirtas aptikti antikūnus prieš 1 tipo (ŽIV-1, ŽIV-1 O grupės) ir 2 tipo (ŽIV-2) žmogaus imunodeficitą virusą žmogaus serume arba plazmoje.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į antikūnų prieš ŽIV 1, įskaitant O grupę, ir ŽIV 2 buvimą arba kaip ŽIV infekcijos diagnostikos priemonę.

SANTRAUKA IR TYRIMO PAAIŠKINIMAS

Yra aprašyti dviejų tipų žmogaus imunodeficitą virusai: ŽIV-1 ir ŽIV-2, kurie sukelia įgytą imunodeficitą sindromą (angl. „Acquired Immunodeficiency Syndrome“, AIDS). Abu jie yra retrovirusai, perduodami per sąlytį su tam tikrais infekuotais kūno skysčiais, visų pirma per kraują ir lyties organų išskyras bei per transplacentinį pasąžą. Apie užsikrėtimus ŽIV-1 gauta pranešimų iš viso pasaulio; apie užsikrėtimus ŽIV-2 daugiausia pranešimų gaunama iš Vakarų Afrikos ir tam tikrų Europos šalių¹. Šių dviejų tipų virusų antigenams būdingas esminis kryžminis jų šerdies baltymų reaktiškumas, bet jų apvalkalų glikoproteinai kryžmiškai reaguoja mažiau. Siekiant užtikrinti antikūnų prieš abiejų tipų įvairių stadijų virusus aptikimą po užsikrėtimo, atliekant skrinimą svarbu naudoti abiejų virusų apvalkalo baltymų epitopus kartu su daugeliu kryžmiškai reaguojančių šerdies baltymų². ŽIV-1 variantų, įvardijamų bendroju O grupės pavadinimu, rasta mėginiuose iš Kamerūno ir Europos^{3,4}. O grupė ryškiai skiriasi nuo žinomų originaliųjų ŽIV-1 potipių (kartu vadinamų M grupe). Konkrečius šio viruso apvalkalo srities epitopus galima naudoti aptinkant O grupės virusus užsikrėtusių asmenų organizme; priklausomybė nuo kryžminio reaktiškumo su žinomų potipių ŽIV yra nepakankama⁵. Ankstyviausias specifinis antikūnų atsakas po užsikrėtimo ŽIV gali būti imunoglobulinas M (IgM), po kurio seka imunoglobulino G (IgG) atsakas⁶. Maksimalus anti-ŽIV serokonversijos jautrumas užtikrinamas atliekant tyrimus, reaguojančius ir su IgM, ir su IgG. „Murex HIV-1.2.O“ turėtų aptikti apvalkalo glikoproteinų IgG ir IgM bei (papildomai) IgA, ir ŽIV-1 bei ŽIV-2 kryžmiškai reaguojančius šerdies baltymus. Dėl to nustatymui galima naudoti potencialiai infekuotus serumo ir plazmos su EDTA arba citratu mėginius.

PROCEDŪROS PRINCIPAS

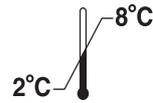
„Murex HIV-1.2.O“ tyrimas atliekamas naudojant mikrošulinėlius, dengtus sintetiniu peptidu iš imunodominantinės ŽIV-1 (O) srities, rekombinaciniu baltymu iš ŽIV-1 ir ŽIV-2 apvalkalo baltymų bei ŽIV šerdies baltymu. Konjugatas yra tų pačių epitopų (visi jie pažymėti krienų peroksidaze) mišinys.

Ėminius ir kontrolės serumus inkubuojant šulinėliuose, mėginyje arba kontrolės serume esantys antikūnai prieš ŽIV rišasi su mikrošulinėlio antigenais; po to mėginys ir antikūnų perteklius nuplaunami. Sekantis veiksmas: pridama konjugato, staigiai susijungiančio su jau su antigenu šulinėlyje surištais specifiniais antikūnais. Jeigu specifinių antikūnų mėginyje nėra, konjugatas su šulinėlio medžiagomis nesijungs. Nesurištas konjugatas išplaunamas ir į šulinėlius įpilama tirpalo su 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidinu (TMB) bei vandenilio peroksidu. Šulinėliai, kuriuose yra surišto konjugato, nusidažo violetine spalva, kuri, sustabdžius reakciją sieros rūgštimi, pasikeičiančia į oranžinę. Po inkubacijos fermentinės reakcijos nutraukiamos paveikus sieros rūgštimi, o spalva nuskaitoma spektrofotometru 450 nm bangų ruože. Šulinėliuose esančio konjugato kiekis (ir taip pat spalvos ryškis) tiesiogiai priklauso nuo antikūnų prieš ŽIV koncentracijos mėginyje.

REAGENTAI

APRAŠYMAS, PARUOŠIMAS NAUDOTI IR REKOMENDUOJAMOS LAIKYMO SĄLYGOS

Taip pat žr. **Įspėjimai ir atsargumo priemonės.**



Visus komponentus reikia laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje, jei nenurodyta kitaip; tokiomis sąlygomis jie išlieka aktyvūs iki rinkinio tinkamumo naudoti datos.

COATED WELLS

1. Dengti šulinėliai

Viena plokštelė (9E25-01) arba 5 plokštelės (9E25-02), kuriose yra po 96 šulinėlius, dengtus ŽIV antigenais.

Jeigu bus naudojama mažiau nei viena plokštelė, prieš išimdami iš maišelio palaukite, kol šulinėliai sušils iki kambario temperatūros (nuo 18 iki 30°C). Nenaudojamus šulinėlius sudėkite į kartu tiekiamą uždaromą maišelį ir laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje.

SAMPLE DIL

2. Mėginių skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 36 mL žaliai rudo buferinio tirpalo ir detergentų. Sudėtyje yra 0,05% konservanto ProClin®.

CONJUGATE

3. Konjugatas

Vienas butelis (9E25-01) arba du buteliai (9E25-02), kuriuose yra raudona užšaldant išdžiovintų ŽIV antigenų, konjuguotų su krienų peroksidaze, granulė. Praskiedus, kiekvieno butelio turinio užtenka ne daugiau nei trims plokštelėms.

CONJUGATE DIL

4. Konjugato skiediklis

Vienas butelis (9E25-01) arba du buteliai (9E25-02), kuriuose yra po 18 mL geltono tirpalo, kurį sudaro buferis, galvijų baltymai ir detergentas. Sudėtyje yra 0,1% konservanto ProClin®.

Konjugato skiedimas

Atsargiai pabelskite konjugato buteliu į stalą, kad pasišalintų prie guminio kamščio prilipusios medžiagos. Visą konjugato skiediklio butelio turinį supilkite į konjugato butelį, vėl uždenkite jį dangteliu ir atsargiai vartydami sumaišykite. Ne trumpiau nei 30 minučių leiskite rehidruotis, retkarčiais pamaišydami. Praskiestas konjugatas turi būti raudonos spalvos.

Praskiestą konjugatą galima laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje ne ilgiau nei aštuonias savaites arba -15°C arba žemesnėje temperatūroje ne ilgiau nei keturias savaites ir atliekant ne daugiau nei keturis užšaldymo ir atitirpinimo ciklus.

CONTROL 1 +



5. Antikūnų prieš ŽIV-1 teigiamas serumas

Vienas butelis, kuriame yra 1,7 mL inaktyvinto žmogaus serumo buferyje su baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL	2	+
---------	---	---



6. Antikūnų prieš ŽIV-2 teigiamas kontrolės serumas

Vienas butelis, kuriame yra 1,7 mL inaktyvinto žmogaus serumo buferyje su baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL	-
---------	---



7. Neigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 2,5 mL normalaus žmogaus serumo, praskiesto galvijų baltymų buferiu. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

SUBSTRATE	DIL
-----------	-----

8. Substrato skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 35 mL bespalvio trinatrio citrato ir vandenilio peroksido tirpalo.

SUBSTRATE	CONC
-----------	------

9. Substrato koncentratas

Vienas butelis, kuriame yra 35 mL 3,3', 5,5' tetrametilbenzidino (TMB) ir stabilizatorių rožiniame tirpale.

Substrato tirpalas

Norėdami paruošti substrato tirpalą, bespalvio substrato skiediklio pripilkite į tokio paties tūrio rožinį substrato koncentratą švarioje stiklinėje arba plastikiniame inde. **Svarbu laikytis šios įpylimo eilės tvarkos, o visos pipetės ir stikliniai indai, naudojami ruošti substrato tirpalą, turi būti švarūs.** Alternatyviai substrato tirpalą galima pagaminti supilant visą substrato skiediklio butelio turinį į substrato koncentrato butelį.

1 lentelė

Reikiamas substrato koncentrato ir substrato skiediklio kiekis

Šulinėlių skaičius	Plokštelių skaičius
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 96	1 2 3 4
Substrato koncentratas (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22
Substrato skiediklis (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22

Naudojant su automatinėmis sistemomis gali reikėti papildomo reagento. Saugokite nuo saulės šviesos. Substrato tirpalas turi būti rožinis; jeigu prieš naudojimą jis yra violetinis, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą.

Vietoj paruošto šio rinkinio substrato tirpalo galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio, kuriam naudojamas rožinis substrato koncentratas, tirpalą. Užtikrinkite, kad substrato tirpalas būtų ruošiamas iš kartu pateikiamo substrato skiediklio ir substrato koncentrato.

Paruoštas substrato tirpalas, laikomas šaldytuve (nuo 2 iki 8°C temperatūroje) arba nuo 15 iki 25°C temperatūroje, išlieka stabilus ne daugiau nei dvi dienas, tačiau jį reikia išmesti, jeigu susidaro kristalų.

WASH	FLUID
------	-------

10. Plovimo skystis

Vienas arba du buteliai, kuriuose yra po 125 mL 20 kartų koncentruoto glicino/borato plovimo skysčio. Sudėtyje yra 0,2% konservanto Bronidox®.

Vieną dalį koncentruoto plovimo skysčio įpilkite į 19 dalių distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad gautumėte reikiamą tūrį, arba praskieskite visą vieno plovimo skysčio butelio turinį, kad gautumėte 2500 mL galutinio tirpalo. Plovimo skysčio koncentrate gali būti kristalų, tačiau šie kristalai ištirps, kai plovimo skystis bus praskiestas iki darbinio stiprumo. Praskiestame plovimo skystyje yra 0,01% konservanto Bronidox®.

Vietoj šio rinkinio plovimo skysčio galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio glicino/borato plovimo skystį.

Darbinio stiprumo plovimo skystį laikykite 18-30°C temperatūroje uždareme inde. Tokiomis sąlygomis jis išliks aktyvus vieną mėnesį.

PASTABA. Laikymo metu plovimo skystis gali pagelsti. Tai neturės įtakos tyrimo atlikimui, jeigu visas plovimo skystis bus išsiurbiamas iš šulinėlių.

PASTABA. Nors galima naudoti kitų rinkinių substrato tirpalą ir plovimo skystį, jų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo datai, atspausdintai ant komponentų etiketės.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

IVD

Reagentai skirti tik *in vitro* diagnostikai.

Tik profesionaliam naudojimui.

Informaciją apie potencialiai pavojingus komponentus galite rasti gamintojo saugos duomenų lape ir gaminio žymėjime.

SVEIKATOS IR SAUGOS INFORMACIJA



ATSARGIAI. Šiame rinkinyje yra žmogaus kilmės komponentų.

Gamybai naudojamas žmogaus serumas buvo patikrintas ir nustatytas jo reagavimas arba nereagavimas su analitėmis, kaip nurodyta 2 lentelėje toliau.

2 lentelė

Komponentas	Reagavo su	Nereagavo su
Neigiama kontrolės medžiaga	Netaikytina	HBsAg, antikūnais prieš ŽIV (1 ir 2 tipo), HCV ir HTLV
Teigiama kontrolės medžiaga 1	antikūnais prieš ŽIV-1	HBsAg
Teigiama kontrolės medžiaga 2	antikūnais prieš ŽIV-2	HBsAg

Be to, teigiamų kontrolės medžiagų gamybai naudojamas žmogaus serumas yra patikrintas dėl antikūnų prieš HCV ir gali būti reaktyvus.

Prieš naudojimą reagento ruošimui, visi naudojami reagavę serumo mėginiai buvo išaktyvinti. Nepaisant to, visas žmogaus kilmės medžiagas reikia laikyti potencialiai infekcinėmis ir su šiuo rinkiniu bei tiriamaisiais bandiniais reikia dirbti laikantis nustatytos geros laboratorinės praktikos.

Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) pavojingi reagentai klasifikuojami ir pažymėti taip:

Reagentai:	CONJUGATE DIL	SAMPLE DIL	CONJUGATE*
Klasifikacija:	Skin Sens. 1H317		
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas		
Simboliai / piktogramos:			

Pavojobingumo frazės:	H317 gali sukelti alerginę odos reakciją.
Atsargumo frazės:	P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P363 užterštus drabužius išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. P333+P313 jei su sudirginama oda arba ją išberia: Kreiptis į gydytoją.
Sudėtis:	Reakcijos masė: 5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (EB Nr. 247-500-7) ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas (EB Nr. 220-239-6) (3:1).
* Praskiestame koniuqate būna 0.1 % „ProClin® 300“, kuri Reqlamente (EB) Nr. 1272/2008 priskiriama pavojingoms medžiagoms.	

Reagentai:	SUBSTRATE CONC
Klasifikacija:	Eye Irrit. 2 H319
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojobingumo frazės:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą
Atsargumo frazės:	P264 po naudojimo kruopščiai nusiplauti rankas. P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lešius. Jei uie iie yra ir jei uie lenqvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

Remiantis Reqlamentu (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) WASH FLUID pažymėtas fraze EUH210 (saugos duomenų lapus galima gauti paprašius).

Papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose, esančiuose interneto svetainėje www.diasorin.com

- Potencialiai kontaminuotas medžiagas reikia šalinti saugiai pagal vietos reikalavimus.
- Išsiliejusias potencialiai infekcines medžiagas reikia nedelsiant surinkti sugeriančiu popieriniu rankšluosčiu, o prieš tęsiant darbą, užterštą vietą reikia nuvalyti, pavyzdžiui, 1,0% natrio hipochloritu⁷. Natrio hipochlorito negalima naudoti išsiliejus medžiagoms, kurių sudėtyje yra rūgšties, išsiliejimo vietos prieš tai sausai nenušluosčius. Išsiliejusioms medžiagos valyti naudojamos priemonės, įskaitant pirštines, turi būti utilizuojamos kaip potencialiai biologiškai pavojingos atliekos. Neautoklavuokite medžiagų, kurių sudėtyje yra natrio hipochlorito.
- Neutralizuotas rūgštis ir kitas skystas atliekas reikia nukenksminti pridėdam pakankamą kiekį natrio hipochlorito, kad galutinį koncentracija būtų mažiausiai 1,0%. Kad nukenksminimas būtų veiksmingas, gali prireikti palikti 1,0% natrio hipochlorito tirpalą 30 minučių.
- Nepipetuokite burna. Naudodami mėginius ir atlikdami tyrimą dėvėkite vienkartinės pirštines ir akių apsaugą. Pabaigę, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Šių reagentų sudėtyje yra nedidelės koncentracijos kenksmingų arba dirginančių medžiagų.
 - Konjugato skiediklyje ir mėginių skiediklyje yra „ProClin® 300“, kuris gali būti absorbuojamas per odą ir kuris yra jautrinanti medžiaga.
- Stabdymo tirpalui reikalinga sieros rūgštis ir stiklinėms priemonėms plauti naudojama druskos rūgštis yra korozinės ir jas reikia naudoti atitinkamai atsargiai. Jeigu kuri nors iš jų pateko ant odos arba į akis, kruopščiai nuplaukite vandeniu.

- Jeigu kurio nors reagento pateko ant odos arba į akis, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.

ANALIZĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Pasibaigus nurodytam galiojimo terminui, reagentų nenaudokite. Reikia vengti mikrobiologinio reagentų užteršimo, nes tai gali sumažinti produkto tarnavimo laiką ir dėl to gauti rezultatai gali būti klaidingi.
- Nekeiskite tyrimo procedūros ir nepakeiskite reagentų kitų gamintojų arba kitos partijos reagentais, nebent nurodyta, kad reagentus galima keisti vienus kitais. Netrumpinkite nurodytos inkubacijos trukmės.
- Prieš naudojimą visus reagentus ir mėginius palaikykite 18-30°C temperatūroje. Iškart po naudojimo visus reagentus grąžinkite į vietą, kurioje yra rekomenduojama laikymo temperatūra.
- Su reagentais naudojamas stiklines priemonės reikia kruopščiai išplauti 2M druskos rūgštimi ir po to išskalauti distiliuotu arba labai kokybišku dejonizuotu vandeniu.
- Nelaikykite reagentų ir mėginių šaldikliuose su automatinio atitirpdymo funkcija.
- Laikymo metu ar inkubacijos etape reagentų neveikite ryškia šviesa ar hipochlorito garais.
- Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.
- Neužterškite vieno reagentų kitais. Naudoti su „Murex“ analizės substrato tirpalu paskirkite atskirą pipetę. Reikia skirti vieną pipetę naudoti su konjugatu.
- Nepalieskite ir neaptašykite šulinėlio krašto konjugatu. Nepūskite skysčių iš mikropipetėčių; jeigu įmanoma, rekomenduojama naudoti reversinį pipetavimą.
- Prieš nuskaitydami plokštelę patikrinkite, ar plokštelės dugnas yra švarus ir sausas, ir ar skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
- Neužterškite mikrošulinėlių dulkelėmis nuo vienkartinų pirštinių.
- Visiškai automatinė mikroplokštelių procesorių naudojimas
 - Nebūtina naudoti plokštelių dangtelių ir sausai iššluostyti šulinėlių.
 - Neleiskite sistemos skysčiams iš visiškai automatizuotų mikroplokštelių procesorių užteršti mėginių ar reagentų.
 - Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimai visiškai automatizuotuose procesoriuose.
- Užtikrinkite, kad tyrimas būtų atliekamas temperatūros ribose, nurodytose tyrimo protokole.
- Nenaudokite CO₂ inkubatorių.
- Nelaikykite stabdymo tirpalo sekliame inde ir po naudojimo nesupilkite jo atgal į atsargų butelį.
- Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimo su instrumentais protokolai.

BANDINIŲ ĖMIMAS, TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

BANDINIŲ ĖMIMAS

Galima naudoti serumo, plazmos su EDTA arba plazmos citratu mėginius. Užtikrinkite, kad serumo mėginiai būtų visiškai sukrešęje. Pašalinkite iš mėginio visas matomas daleles centrifuguodami. Jeigu mėginiai paruošti naudojant skystus antikoagulantus (pvz., plazma su citratu), reikia apsvarstyti skiedimo poveikį.

BANDINIŲ TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

Mėginius laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje. Jeigu mėginių nereikia tirti per 7 dienas, juos reikia atskirti nuo krešulio arba ląstelių agregatų ir laikyti užšaldytus (-15°C arba žemesnėje temperatūroje). Venkite daugkartinių užšaldymo ir atitirpinimo ciklų. Atitirpinę užtikrinkite, kad mėginiai prieš tyrimą būtų kruopščiai išmaišyti.

PROCEDŪRA

NEPATEIKTOS, TAČIAU REIKALINGOS MEDŽIAGOS

- Sustabdymo tirpalas (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgštis)**, pvz., nuo 3 mL (0,5M tirpalui) iki 11 mL (2,0M tirpalui) laboratorinės paskirties koncentruotos sieros rūgštis (18,0M) įpilkite į maždaug 80 mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens, po to papildykite vandens iki 100 mL bendrojo tūrio. Alternatyviai galima naudoti šį reagentą: 1N sieros rūgštis (kodas N0164, 15 flakonų pakuotė, ir N0165, 1 flakono pakuotė).
- Plovimo skysčiui praskiesti, stabdymo tirpalui paruošti ir naudoti kartu su automatinėmis plovyklėmis reikia **šviežio distiliuoto arba aukštos kokybės dejonizuoto vandens**.
- Atitinkamo tūrio **mikropipetės ir daugiakanalės mikropipetės**.
- Inkubatorius**, galintis palaikyti tyrimo protokole nurodyto diapazono temperatūrą.
- Forminis šildymo blokas** (kodas 5F09-02). Skirtas naudoti laboratorijos inkubatoriuose. Geriausia forminį šildymo bloką laikyti naudojamame inkubatoriuje. Jeigu tai neįmanoma, jį reikia įdėti į inkubatorių ne mažiau nei keturias valandas iki tyrimo pradžios.
- Instrumentai**
 - Automatinė mikroplokštelių juostų plovyklė,
 - Mikroplokštelių skaitytuvas arba
 - Visiškai automatinis mikroplokštelių procesorius.Prieš naudojimą reikia patikrinti visų instrumentų tinkamumą naudoti.
Išsamios informacijos apie rekomenduojamas instrumentų ir tinkamumo įvertinimo procedūrų sistemas ir programinės įrangos protokolus kreipkitės į vietos atstovybę.
- Vienkartiniai reagentų loveliai**. (Kodas 5F24-01).
- Natrio hipochloritas dekontaminavimui**. (Žr. skyrių „Sveikatos ir saugos informacija“).
- Natrio hidroksido tirpalas** (0,1M) (instrumentų dekontaminavimui).

TYRIMO PROCEDŪRA

Prieš atlikdami tyrimą atidžiai perskaitykite skyrių **Analizės atsargumo priemonės**.

Įvairių tyrimo komponentų įpylimą į šulinėlius galima patvirtinti plika akimi patikrinant plokštelę, ar spalvos yra kaip nurodyta:

Mėginių skiediklis yra žaliai rudos spalvos. Pridėjus mėginio arba kontrolės medžiagos, spalva pasikeis į mėlynai žalią. Skirtingų mėginių spalvos kis įvairiai, tačiau visada turi būti matomas pokytis.

Praskiestas konjugatas yra raudonos spalvos.

Substrato tirpalas iš pradžių yra rožinis, o reaguojančiuose šulinėliuose tampa violetinis. Pridėjus stabdymo tirpalo, violetinė reaguojančių šulinėlių spalva pakinta į oranžinę, o nereaguojančių šulinėlių lieka rožinė.

Mėginio ar reagento pridėjimą galima patvirtinti naudojant mikroplokštelių skaitytuvą: mėginių skiediklis su mėginiu nuskaitomas 570 nm arba 620 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), konjugatas nuskaitomas 490 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), o substrato tirpalai – 490 nm bangų ruože (referencijos nėra).

Šulinėlius su mėginių skiedikliu prieš mėginio įpylimą galima laikyti ne ilgiau nei 30 minučių 18–30°C temperatūroje ir ne ilgiau nei 15 minučių po mėginių arba kontrolės medžiagų pridėjimo prieš pradėdant **5 veiksmą**.

PUSIAUS AUTOMATINIS APDOROJIMAS

1 veiksmas	Praskieskite ir sumaišykite konjugatą , paruoškite substrato tirpalą ir plovimo skystį .	
2 veiksmas	Naudokite tik tyrimui būtina šulinėlių kiekį . Stenkitės neprisiliesti prie šulinėlių viršaus arba dugno.	
3 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 25 µL mėginių skiediklio .	50 µL
4 veiksmas	Į šulinėlius įpilkite 100 µL mėginio arba 100 µL kontrolės medžiagų . Kiekvienos plokštelės pirmąjį šulinėlių stulpelį naudokite tyrimo kontrolės medžiagoms. Padalinę mėginius, kontrolės medžiagas įpilkite į tam skirtus šulinėlius. 50 µL neigiamos kontrolės medžiagos įlašinkite į kiekvieną iš trijų šulinėlių nuo A1 iki C1, o 50 µL antikūnų prieš ŽIV-1 ir ŽIV-2 teigiamos kontrolės medžiagų į šulinėlius nuo D1 iki E1 (atitinkamai). Baltame fone bus lengviau matyti, kad įpilta mėginio.	50 µL
5 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubukite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje.	30 min
6 veiksmas	Baigusis inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite , kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros .	
7 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 50 µL substrato tirpalo	50 µL
8 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubukite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje.	30 min
9 veiksmas	Baigusis inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite , kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros .	
10 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL substrato tirpalo .	100 µL
11 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubukite 30 minučių 37°C (± 1°C) temperatūroje.	30 min
	Saugokite nuo tiesioginės saulės šviesos. Šulinėliai, kuriuose yra reaguojančių mėginių, nusidažys violetine spalva.	
12 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL sustabdymo tirpalo (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgštis).	50 µL
13 veiksmas	15 minučių laikotarpyje nuskaitykite absorbuojamąją gebą 450 nm bangų ruože; jeigu yra, referencijai naudokite nuo 620 iki 690 nm ilgio bangų ruožą. Atlikite tuščiąjį matavimą instrumentu (be plokštelės laikiklyje).	A₄₅₀

PLOVIMO PROCEDŪROS

Vietos atstovybėje galite gauti plovyklį, kurias rekomenduojama naudoti, ir plovyklį bei analizatorių tikrinimo procedūrų protokolus. Rekomenduojama naudoti šį protokolą:

a. Automatinės mikroplokštelių juostų plovyklės protokolas

Atlikite 5 plovimo ciklus, naudodami darbinio stiprumo plovimo skystį. Jeigu įmanoma, užtikrinkite, kad:

- Su DiaSorin tiekiamais instrumentais būtų naudojama 500 µL/šulinėliui užpildymo tūrio pratekančioji plovimo srovė. Jeigu naudojami kiti instrumentai, su kuriais tai neįmanoma, užtikrinkite, kad šulinėlis būtų visiškai užpildytas.

- ii) Įpylimo aukštis nustatytas taip, kad užpildytų visą šulinėlį su nedideliu teigiamu paviršiaus išsipūtimu, bet nebūtų perpildos.
- iii) Vienam įsiurbimo/plovimo/mirkymo ciklui atlikti reikia maždaug 30 sekundžių.
- iv) Užtikrinkite, kad šulinėlyje neliktų skysčio (jeigu galima, pabaigos cikle atlikite du įsiurbimo veiksmus).
- v) Baigus plovimą, apverskite plokštelę ir iškratykite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.

PASTABA. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.

Baigus tyrimą, plovykles reikia išskalauti distiliuotu vandeniu, kad neužsikimštų ir nevyktų korozija.

VISIŠKAI AUTOMATINIS MIKROPLOKŠTELIŲ PROCESORIUS

Išsamios informacijos apie šiuo metu esančius įvertinto tinkamumo protokolus, kreipkitės į vietos atstovybę. Jeigu naudojate instrumentus, neturinčius protokolų, kurių tinkamumas įvertintas, rekomenduojama laikytis šių nurodymų.

1. Nesuprogramuokite trukmės, mažesnės nei nurodyta procedūroje.
2. Galima suprogramuoti nuo 30 iki 35 minučių (arba $32,5 \pm 2,5$ min) inkubacijos trukmę.
3. Šulinėlius su mėginių skiedikliu prieš mėginio įpylimą galima laikyti ne ilgiau nei 30 minučių $18-30^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir ne ilgiau nei 15 minučių po mėginių ir kontrolės medžiagų pridėjimo prieš pradėdant 5 veiksmą.
4. Užtikrinkite, kad būtų laikomasi visų analizės atsargumo priemonių.
Prieš naudojimą pagal vietoje nustatytas procedūras reikia išsamiai įvertinti sudarytų protokolų tinkamumą pagal šias gaires.

REZULTATAI

REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS

Skaičiuojant ir interpretuojant tyrimo rezultatus kiekvieną plokštelę reikia analizuoti atskirai.

Rezultatus skaičiuoti ir interpretuoti reikia naudojant patvirtintą programinę įrangą.

Neigiama kontrolės medžiaga

Apskaičiuokite vidutinę neigiamų kontrolės medžiagų absorbuojamąją gebą.

Pavyzdys:

1 šulinėlis = 0,084

2 šulinėlis = 0,086

3 šulinėlis = 0,070

Iš viso = 0,240

Neigiamos kontrolės medžiagos vidurkis = $0,240/3 = 0,080$

Jeigu bent vieno iš neigiamos kontrolės šulinėlių absorbuojamoji geba daugiau nei 0,15 virš leistino visų trijų vidurkio, tą vertę atmeskite ir apskaičiuokite naują neigiamos kontrolės vidurkį pagal du likusius kartotinius.

Kirpinio vertė

Apskaičiuokite kirpinio vertę prie neigiamos kontrolės kartotinių reikšmių vidurkio pridėdami 0,2 (žr. aukščiau).

Neigiamos kontrolės vidurkis = 0,080

Kirpinio vertė = $0,080+0,200=0,280$

KOKYBĖS KONTROLĖ

Tyrimo rezultatai yra galiojantys, jeigu atitinka šiuos kontrolės kriterijus:

Neigiama kontrolės medžiaga

Vidutinė absorbuojamoji geba turi būti mažesnė nei 0,3.

Teigiamos kontrolės medžiagos

Kiekvienos teigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba turi būti daugiau nei 0,8 vertės didesnė nei vidutinė neigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba.

Tyrimus, kurie neatitinka šių kriterijų, reikia pakartoti.

Nors tai mažai tikėtina, bet jeigu rezultatai pakartotinai neatitinka kokybės kontrolės kriterijų arba tikėtino tyrimo funkcionalumo, kreipkitės į vietos atstovybę.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Nereaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra mažesnė už kirpinio vertę laikomi šiam tyrimui neigiamais.

Reaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra lygi kirpinio vertei arba didesnė už ją laikomi pradiniai reagavusiais su tyrimu (žr. **Procedūros apribojimai**).

Tokius mėginius reikia pakartotinai ištirti du kartus naudojant originalų šaltinį. Mėginiai, kurie reagavo bent viename iš dviejų pakartotinių tyrimų, laikomi kartotinai reaguojančiais su „Murex HIV-1.2.O“ ir daroma prielaida, kad juose yra antikūnų prieš ŽIV-1 arba ŽIV-2. Tokius mėginius reikia tirti toliau ir patvirtinti antikūnų prieš ŽIV buvimą kitais metodais. Nereaguojantys mėginiai, pvz., tokie, kurių absorbuojamoji geba mažesnė už kirpinio vertę, laikytini nereaguojančiais su antikūnais prieš ŽIV.

Jeigu neprisidėta mėginio

Šulinėlių, į kuriuos neprisidėta mėginio, tačiau įpilta visų reagentų, absorbuojamosios gebos vertės gali būti žymiai aukštesnės nei neigiamos kontrolės medžiagos.

SPECIFINĖS TYRIMO FUNKCIONALUMO CHARAKTERISTIKOS

„Murex HIV-1.2.O“ funkcionalumas nustatytas tiriant mėginius, paimtus iš rutininių kraujo donorų, AIDS sergančių pacientų (su diagnoze, nustatyta pagal CDC kriterijus), su AIDS susijusį kompleksą (angl. ARC) turinčių pacientų ir kitų pacientų, kuriems kitais tyrimais nustatyta antikūnų prieš ŽIV-1 (įskaitant O grupę), pacientų su patvirtinta ŽIV-2 infekcija ir ŽIV infekcijos arba kitų klinikinių kategorijų rizikos grupės pacientų. Be to, jo atlikimo efektyvumas buvo vertinamas naudojant rinkoje esančius serokonversijos plokšteles.

1. Donorų mėginiai

Studijoje, kurios metu keturiuose kraujo perpilimo centruose naudojant „Murex HIV-1.2.O“ tyrimą buvo atliktas iš viso 8225 rutininių kraujo donorų mėginių skringas, nustatytas $\geq 99,5\%$ „Murex HIV-1.2.O“ tyrimo specifiskumas. Šioje studijoje 99,91% (8218/8225) mėginių nereagavo, o 0,09% (7/8225) reagavo pakartotinai. Pakartotinai reagavusius mėginius ištyrus dėl antikūnų prieš ŽIV-1 arba ŽIV-2 buvimą, teigiamų rezultatų patvirtinta nebuvo.

Apskaičiuotasis „Murex HIV-1.2.O“ diagnostikos jautrumas tikėtina neigiamų Europos kraujo donorų grupėje yra 99,91% (8218/8225), o binominio skirstinio 95% pasikliauties intervalas yra nuo 99,82% (8211/8225) iki 99,97% (8223/8225).*

2. Klinikiniai mėginiai

Naudojant „Murex HIV-1.2.O“ ištirta iš viso 1895 mėginių. Mėginiai buvo surinkti iš kelių Europos retrovirusologijos laboratorijų. Tai buvo tokie mėginiai:

- 1455 mėginiai, kuriuose antikūnų buvo aptikta alternatyvių formų imunifermentiniais tyrimais ir (arba) „Western blot“ metodu. Tarp jų buvo 1254 mėginiai, paimti iš pacientų su įvairių stadijų ŽIV-1 infekcija (įskaitant 58 mėginius, paimtus iš pacientų, kurie (manoma) užsikrėtę O grupės infekcija) ir 201 mėginys, paimtas iš pacientų, užsikrėtusių ŽIV-2.
- 440 mėginių iš pacientų, sergančių su ŽIV nesusijusiomis ligomis.

Šioje ribotoje studijoje naudojant „Murex HIV-1.2.O“ ŽIV antikūnų aptikta visuose 1455 a) grupės mėginiuose ir nė viename iš 440 b) grupės mėginių. Santykinis „Murex HIV-1.2.O“ jautrumas šių grupių mėginiuose buvo 100% (1455/1455), o binominio skirstinio 95% pasikliauties intervalas – nuo 99,75% (1451/1455) iki 100%. Naudojant „Murex HIV-1.2.O“ ištirta iš viso 18 ŽIV-1 serokonversijos panielių. Referenciniu kriterijumi laikant ir šerdies (p24) ir apvalkalo (gp120/160) juostos buvimą „Western blot“ tyrime, naudojant „Murex HIV-1.2.O“ tyrimu antikūnai prieš ŽIV visuose panieliuose aptikti anksčiau arba tame pačiame mėginyje, kaip naudojant „Western blot“ metodu.

3. Tyrimo atkuriamumas

Naudojant tyrimo kontrolės medžiagas ir kokybės kontrolės panelio komponentus, trijuose laboratorijose buvo įvertintas „Murex HIV-1.2.O“ vienos partijos ir skirtingų partijų atkuriamumas. Studijos rezultatų suvestinė pateikiama 3 lentelėje ir 4 lentelėje.

* Pateikiami tipiniai funkcionalumo duomenys: skirtingose laboratorijose gaunami kitų gyventojų grupių rezultatai gali skirtis.

3 lentelė
„Murex HIV-1.2.O“ – skirtingų partijų tyrimo atkuriamumas (vidutinė absorbuojamoji geba ir variacijos koeficientas VK)

Centras	Rinkinio neigiama kontrolės medžiaga	Rinkinio ŽIV-1 teigiama kontrolės medžiaga	Rinkinio ŽIV-2 teigiama kontrolės medžiaga	QC1362	QC1366
1 laboratorija	0,157 (VK 17,5%)	1,465 (VK 17,3%)	1,399 (VK 17,1%)	0,987 (VK 19,9%)	1,300 (VK 23,4%)
2 laboratorija	0,115 (VK 6,7%)	1,372 (VK 9,7%)	1,344 (VK 13,4%)	0,934 (VK 15,3%)	1,240 (VK 14,7%)
3 laboratorija	0,125 (VK 6,8%)	1,203 (VK 5,2%)	1,069 (VK 6,3%)	0,902 (VK 6,3%)	0,971 (VK 7,0%)

4 lentelė
„Murex HIV-1.2.O“ – vienos partijos tyrimo atkuriamumas

	QC1362	QC1363	QC1364	QC1376
Vidurkis	0,79	0,55	0,73	0,22
VK	10,1%	8,8%	11,7%	5,0%

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Būtina laikytis skyriuose „Tyrimo procedūra“ ir „Rezultatų interpretavimas“ pateiktą nuorodą.
- Tyrimas buvo įvertintas tik naudojant atskirų individų (ne jungtinio) serumo, plazmos su EDTA arba plazmos su citratu mėginius. Kitoms paskirtims „Murex HIV-1.2.O“ nebuvo įvertintas.
- Neigiami antikūnų nustatymo tyrimo rezultatai neatmeta infekcijos galimybės.
- Teigiamus rezultatus, kurių neįmanoma pakartoti, galima gauti atliekant bet kurią EIA procedūrą.

5. Dažniausi klaidų šaltiniai yra:

- Netikslus mėginio, konjugato arba substrato įpylimas į šulinėlius.
- Substrato užteršimas konjugatu.
- Užteršimas konjugatais iš kitų tyrimų.
- Užsikimšę arba iš dalies užsikimšę plovyklės zondai.
- Nepakankamas įsiurbimas, dėl ko šulinėliuose liko nedidelis kiekis plovimo skysčio.
- Prieš plokštelės nuskaitymą nepatikrinus, ar šulinėlių dugnas yra švarus bei sausas ir ar šulinėliuose esančio skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
- Nepavykęs nuskaitymas tinkamo ilgio bangose arba netinkamo ilgio referencinių bangų naudojimas.
- Į mėgintuvėlius su citratu paimtų bandinių absorbuojamoji geba gali būti didesnė.
- Naudojant labai hemolizuotus mėginius, ne visiškai sukrešėjusį serumą, plazmos mėginius su fibrinu arba mikrobiologiškai užterštus mėginius gali padaugėti klaidingų rezultatų.
- Šis tyrimas nebuvo įvertintas dėl galimybės naudoti tiriant lavonų mėginius.

LITERATŪRA

- Clavel, F.** (1987). HIV-2: the West African AIDS virus. *AIDS*, **1**, 135.
 - Denis, F., Leonard, G.** et al. (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 1000.
 - Van den Haesevelde, M., Decourt, J.** et al. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.*, **68**, 1586.
 - Gürtler, L.G., Hauser, P.H.** et al. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.*, **68**, 1581.
 - Loussert-Ajaka, I., Ly, T.D.** et al. (1994). HIV-1/HIV-2 seronegativity in HIV subtype O infected patients. *Lancet*, **343**, 1393.
 - Gains, H., von Sydons, H.** et al. (1988). Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS*, **2**, 11.
 - Centres for Disease Control** (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.
- Bronidox® ir ProClin® nėra bendrovės DiaSorin prekių ženklai.



DiaSorin S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

D11DS94GB,
September 2014

Revised July, 2022

Murex anti-HCV (version 4.0)

An enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in human serum or plasma

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

This instructions for use must be read carefully prior to use. The instructions for use must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions for use.

IVD

Key to symbols used			
	List Number		<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	Lot Number		Store at 2-8°C
	Expiration Date		CAUTION: Consult accompanying documents
	Manufacturer		Consult instructions for use
			Keep away from sunlight

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.

2.3. Reagentai yra skirti Hepatito C antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 480 testų. Visos tyrimo inkubacijos turi būti atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms naudojami 3 šulinėliai.

INTENDED USE

Murex anti-HCV (version 4.0) is an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) in human serum or plasma. It is intended to provide improved early detection of HCV infection in blood screening and clinical settings.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Hepatitis C (HCV) is now recognised as the primary cause of transfusion associated non A non B hepatitis¹. HCV is a single stranded positive-sense RNA virus sharing similarity with flaviviruses and pestiviruses^{2,3} and is global in distribution. Although the acute presentation of HCV infection is generally mild, often clinically asymptomatic, with only 10 to 25% of patients developing jaundice, greater than 50% of infected individuals go on to develop chronic hepatitis with serious and possibly life threatening sequelae such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma^{4,5}. Estimates of HCV prevalence in blood donors world-wide range from 0.5 to 8%⁶, although with improved sensitivity and specificity of the diagnostic tests and donor selection, declining incidence has been reported. Data suggests that the incidence is from 0.1 to 1.5% in Europe and 0.6% in the USA⁷.

Diagnosis of HCV is dependent on the direct detection of viral RNA by PCR or by detection of anti-HCV antibodies. Recombinant DNA techniques have been used to develop structural and non-structural proteins derived from HCV RNA with utility for testing of antibodies to HCV. Anti-HCV assays have evolved from first generation products incorporating NS4 proteins only through to third generation assays incorporating core (structural), NS3 protease/helicase (non-structural), NS4 (non-structural) and NS5 replicase (non-structural) proteins. Studies report that the third generation assays demonstrate significant improvements in sensitivity, particularly with regard to increased reactivity with the NS3 antigen and earlier detection of seroconversion⁸.

Murex anti-HCV (version 4.0) utilises antigens from the core, NS3, NS4 and NS5 regions of the virus. Antigens have been carefully developed and selected to provide a sensitive and specific diagnostic test.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

In Murex anti-HCV (version 4.0) diluted specimen is incubated in microwells coated with highly purified antigens which contain sequences from the core, NS3, NS4 and NS5 regions of HCV. During the course of the first incubation any anti-HCV antibodies in the specimen will bind to the immobilised antigens. Following washing to remove unbound material, the captured anti-HCV antibodies are incubated with peroxidase conjugated monoclonal anti-human IgG. During the course of the second incubation the conjugate will bind to antibody immobilised in the first step. After removal of excess conjugate, bound enzyme is detected by the addition of a solution containing 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide. A purple colour will develop in the wells which contained anti-HCV reactive specimens.

The enzyme reaction is terminated with sulphuric acid to give an orange colour which is read photometrically. The amount of Conjugate bound, and hence colour, in the wells, is directly related to the concentration of antibody in the specimen.

REAGENTS

DESCRIPTION, PREPARATION FOR USE AND RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS

See also **Warnings and Precautions**.



All components must be stored at 2 to 8°C, unless otherwise stated, under which condition they will retain activity until the expiry date of the kit.

COATED WELLS

1. Coated Wells

One plate (7F5156) or five plates (7F5157) each made up of 96 microwells coated with purified HCV antigens.

Allow the wells to reach 18 to 30°C before removing from the bag. If less than the whole plate is being used, reseal unused strips in the original foil storage bag or in the plastic snap seal bag provided along with the desiccant sachet and return to 2 to 8°C for up to 6 months after the first opening.

SAMPLE DIL

2. Sample Diluent

One bottle of 20 ml (7F5156), or one bottle of 100 ml (7F5157) of buffer containing proteins of bovine origin. Contains 0.05% Bronidox[®] and 0.1% Sodium azide as preservatives.

CONTROL - ⚠

3. Negative Control

One bottle containing 0.8 ml of normal human serum diluted in a buffered solution containing protein of bovine origin. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.

CONTROL + ⚠

4. Anti-HCV Positive Control

One bottle containing 0.6 ml of inactivated human serum consisting of antibodies to HCV diluted in a buffered solution containing protein of bovine origin. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.

CONJUGATE DIL

5. Conjugate Diluent

One bottle (7F5156) or three bottles (7F5157) containing 20 ml of buffered solution consisting of inorganic salts and bovine protein with 0.05% Bronidox[®] preservative.

CONJUGATE



6. Conjugate

One bottle (7F5156) or three bottles (7F5157) each containing enough freeze dried horseradish peroxidase-labelled mouse monoclonal antibody to human IgG in a bovine protein base to perform 192 tests.

Reconstitute at least 15 minutes prior to use to ensure complete dissolution. Bring a bottle of Conjugate Diluent to room temperature. Tap the bottle of Conjugate gently on the bench to remove any material adhering to the rubber stopper. Carefully remove the stopper and pour the Conjugate Diluent into the bottle. Recap and allow to stand with occasional swirling and inversion.

After reconstitution, store at 2 to 8°C for up to seven days or frozen (-15°C or colder) in aliquots for up to six months. The reconstituted Conjugate can be freeze/thawed up to four times. Keep away from sunlight.

SUBSTRATE	DIL
-----------	-----

7. Substrate Diluent

One bottle containing 35 ml of a colourless solution of tri-sodium citrate and hydrogen peroxide.

SUBSTRATE	CONC
-----------	------



8. Substrate Concentrate

One bottle containing 35 ml of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and stabilisers in a pink solution.

Substrate Solution

To prepare the Substrate Solution add a volume of colourless Substrate Diluent to an equal volume of pink Substrate Concentrate in either a clean glass or plastic vessel. **It is important that this order of addition is followed and that any pipettes and glassware used to prepare Substrate Solution are clean.**

Alternatively, the Substrate Solution may be made by pouring the entire contents of the bottle of Substrate Diluent into the bottle of Substrate Concentrate. One bottle of Substrate Solution provides sufficient reagent for at least five plates – see Table 1.

Table 1
Volume of Substrate Concentrate and Substrate Diluent Required

Number of Wells											Number of Plates			
8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	1	2	3	4
Substrate Concentrate (ml)														
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0	6	12	18	22
Substrate Diluent (ml)														
1.0	1.5	2.0	2.5	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0	6	12	18	22

Additional reagent may be required for use with automated systems. Keep away from all natural and artificial light. The Substrate Solution should be pink; if it is purple before being used, it should be discarded and fresh Substrate Solution prepared.

The prepared Substrate Solution from this kit may be used interchangeably with that from all other Murex kits which use pink coloured Substrate Concentrate. Ensure that the Substrate Solution is prepared from the Substrate Diluent and Substrate Concentrate provided together.

The prepared Substrate Solution is stable refrigerated (2 to 8°C) or at 15 to 25°C for up to two days but must be discarded if crystals have formed.

9. Wash Fluid

One (7F5156) or two bottles (7F5157) containing 125 ml of 20 times working strength Glycine/Borate Wash Fluid. Contains 0.2% Bronidox® preservative.

Add one volume of Wash Fluid concentrate to 19 volumes of distilled or deionised water to give the required volume or dilute the entire contents of one bottle of Wash Fluid to a final volume of 2500 ml. Crystals may be observed in the Wash Fluid Concentrate but these crystals will dissolve when the Wash Fluid is diluted to working strength. When diluted the Wash Fluid contains 0.01% Bronidox® preservative.

The Wash Fluid from this kit may be used interchangeably with the Glycine/Borate Wash Fluid from any other Murex kit.

Store the working strength Wash Fluid at 18 to 30°C in a closed vessel under which conditions it will retain activity for one month.

NOTE: The Wash Fluid may develop a yellow colour on storage. This will have no effect on the performance of the assay providing the Wash Fluid is fully aspirated from the wells.

NOTE: Although the Substrate Solution and Wash Fluid are interchangeable, they must not be used beyond the expiry date printed on the component labels.

WASH	FLUID
------	-------

WARNINGS AND PRECAUTIONS

IVD

The reagents are for *in vitro* diagnostic use only.

For professional use only.

Please refer to the manufacturer's safety data sheet and the product labelling for information on potentially hazardous components.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION



CAUTION: This kit contains components of human origin.

The human sera used for manufacture have been screened and found reactive or non-reactive for analytes as shown in Table 2 below.

Table 2

Component	Reactive for	Non-reactive for
Negative Control	N/A	antibodies to HCV, HIV (types 1 and 2), and HBsAg
Positive Control	antibodies to HCV	HBsAg and antibodies to HIV (types 1 and 2)

All reactive serum used has been inactivated prior to use in reagent preparation. However, all material of human origin should be considered as potentially infectious and it is recommended that this kit and test specimens be handled using established good laboratory practice.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP) hazardous reagents are classified and labelled as follow:

REAGENTS:	WASH FLUID
SIGNAL WORD:	EUH210 Safety Data Sheet available on request.
SYMBOLS / PICTOGRAMS:	---
HAZARD STATEMENTS:	---
PRECAUTIONARY STATEMENTS:	---
CONTAINS:	---

REAGENTS:	SUBSTRATE CONC
SIGNAL WORD:	Warning
SYMBOLS / PICTOGRAMS:	
HAZARD STATEMENTS:	H319 Causes serious eye irritation.
PRECAUTIONARY STATEMENTS:	---
CONTAINS:	P264 Wash hands thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

REAGENTS:	SAMPLE DIL
SIGNAL WORD:	---
SYMBOLS / PICTOGRAMS:	---
HAZARD STATEMENTS:	EUH032 Contact with acids liberates very toxic gas.
PRECAUTIONARY STATEMENTS:	---
CONTAINS:	---

REAGENTS:	CONTROL + 
SIGNAL WORD:	EUH210 safety data sheet available on request.
SYMBOLS / PICTOGRAMS:	---
HAZARD STATEMENTS:	---
PRECAUTIONARY	---
STATEMENTS:	---
CONTAINS:	---

For additional information see Safety Data Sheets available on www.diasorin.com.

- Potentially contaminated materials should be disposed of safely according to local requirement.
- Spillage of potentially infectious material should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued⁹. Sodium hypochlorite should not be used on acid containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
- Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
- Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- The following reagents contain low concentrations of harmful substances:
 - The Sample Diluent contains saponin and detergents.
- Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If either come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
- If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

ANALYTICAL PRECAUTIONS

- Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
- Do not modify the **Test Procedure** or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
- Allow all reagents and specimens to come to 18 to 30°C before use. Immediately after use return all reagents to the recommended storage temperature.
- Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionised water.
- Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of reagents and specimens.
- Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
- Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
- Do not cross-contaminate reagents. Dedicate a pipette for use with the Substrate Solution of Murex assays. A pipette should also be dedicated for use with the Conjugate.
- Do not touch or splash the rim of the well with Conjugate. Do not blow out from micropipettes; reverse pipetting is recommended wherever possible.
- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
- Do not contaminate microwells with dust from disposable gloves.
- When using fully automated microplate processors:
 - It is not necessary to use plate lids and to tap dry the wells.
 - Do not allow system fluids from fully automated microplate processors to contaminate the specimens or reagents.
 - The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assays on fully automated processors.

- Cross contamination between assays needs to be considered when validating assays protocols on automated microplate processors.
- Ensure the assay is run within the temperature limits defined in the assay protocol.
- Do not use CO₂ Incubators.
- Do not store the Stop Solution in a shallow dish nor return it to a stock bottle after use.
- It is important that specimens and controls are thoroughly mixed with the Sample Diluent. Failure to do this may cause erroneous results. Adequate mixing can be achieved by:
 - Manual mixing by pipetting up and down at least four times when adding specimens or controls.
 - Placing the plate on a microplate shaker at a speed of 800 rpm for 30 seconds.

Users of automatic sample dispensers may find it convenient to add 90 µl of Sample Diluent to the wells, followed by 20 µl of Specimen then the remaining 90 µl of Sample Diluent. This procedure will ensure adequate mixing.

- The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assay protocols on instrumentation.

SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

SPECIMEN COLLECTION

Serum, EDTA plasma, citrate plasma or heparin plasma specimens may be used. Blood collected by venepuncture should be allowed to clot naturally. Ensure that the serum specimens are fully clotted. Remove any visible particulate matter from the specimen by centrifugation.

If specimens are prepared using liquid anti-coagulant e.g. citrate plasma, the dilution effect should be considered.

SPECIMEN TRANSPORT AND STORAGE

Store specimens at 2 to 8°C. Specimens not required for assay within seven days should be removed from the clot or cell pellet and stored frozen (-15°C or colder). Avoid multiple freeze-thaw cycles. After thawing, ensure specimens are thoroughly mixed before testing.

PROCEDURE

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid)** e.g. add between 3 ml (for 0.5M) and to 11 ml (for 2.0M) of analytical grade concentrated sulphuric acid (18.0 M) to about 80 ml of distilled or deionised water and then make up to 100 ml with more water. Alternatively, the following reagent can be used: 1N Sulphuric Acid Code N0165 (1 vial pack) or code N0164 (15 vial pack).
- Freshly distilled or high quality deionised water** is required for dilution of Wash Fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
- Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
- Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
- Moulded Heating Block** (code 5F09-02). For use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
- Instrumentation**
 - Automated microplate strip washer.
 - Microplate reader.

or

 - Fully automated microplate processor.

All instruments must be validated before use.

Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
- Disposable Reagent Troughs.** (Code No. 5F24-01).
- Sodium hypochlorite** for decontamination. (**Refer to Health and Safety Information**).

TEST PROCEDURE

Please read '**Analytical Precautions**' carefully before performing the test. Addition of the various components of the assay to the wells may be confirmed visually by examining the plate for the following colours.

Sample Diluent is green/brown in colour. On addition of the Specimen or Control the colour will change to blue/green. The colour change may vary from specimen to specimen but some change should always be visible.

Conjugate is brown in colour.

Substrate Solution is initially pink with any positive wells becoming purple. On addition of **Stop Solution** the purple colour of the positives will change to orange, whilst the negatives remain pink.

2.3. Reagentai yra skirti Hepatito C antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 480 testų. Visos tyrimo inkubacijos turi būti atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms naudojami 3 šulinėliai.

The addition of specimen or reagent can be confirmed using a microplate reader as follows: Sample Diluent plus Specimen read at 620 nm or 570 nm with a reference at 690 nm, Conjugate at 410 nm with a reference at 690 nm, Substrate Solution at 490 nm (no reference).

SEMI AUTOMATED PROCESSING

Step 1	Reconstitute the Conjugate with Conjugate Diluent and prepare the Substrate Solution and dilute the Wash Fluid .	
Step 2	Use only the number of strips required for the test.	
Step 3	Add 180 µl of Sample Diluent to each well.	180 µl
Step 4	Add 20 µl of Specimens or Controls to the wells. If using two strips or less pipette one Negative Control to well A1 and one Positive Control to well B1. <u>If using more than two strips it is recommended that two wells of Negative Control are used for additional security.</u> Add the Controls to the designated wells on each plate after dispensing the specimens. The use of a white background will aid visualisation of specimen addition. Specimens and Controls must be thoroughly mixed with the Sample Diluent.	20 µl
Step 5	Cover the wells with the lid and incubate for 1 hour at 37°C ± 1°C.	1 hour
Step 6	At the end of the incubation period wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 7	Immediately after washing the plate, add 100 µl of Conjugate to each well.	100 µl
Step 8	Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ± 1°C.	30 mins
Step 9	At the end of the incubation period wash the plate as described under Wash Procedures .	
Step 10	Immediately after washing the plate, add 100 µl of Substrate Solution to each well.	100 µl
Step 11	Cover the wells with a lid and incubate for exactly 30 minutes at 37°C ± 1°C while colour develops. Keep away from direct sunlight. A purple colour should develop in wells containing reactive specimens.	30 mins
Step 12	Add 50 µl of Stop Solution (0.5M to 2M sulphuric acid) to each well.	50 µl
Step 13	Within 15 minutes read the absorbance at 450 nm using 620 nm to 690 nm as the reference wavelength if available. Blank the instrument on air (no plate in the carriage).	450 nm

WASH PROCEDURES

Protocols for recommended washers and procedures for verifying washers and analysers can be obtained from your representative. The following protocol is recommended:

a) **Protocol for automated microplate stripwasher**

Perform 5 wash cycles using working strength Wash Fluid. Ensure, where possible, that:

- Flow-through washing with a fill volume of 500 µl/well is used with instrumentation supplied by DiaSorin. When using other instrumentation, for which this is not possible, ensure that the well is completely filled.
- The dispense height is set to completely fill the well with a slight positive meniscus without causing an overflow.
- The time taken to complete one aspirate/wash/soak cycle is approximately 30 seconds.
- Ensure that no liquid is left in the well (by use of a double aspirate step in the final cycle where possible).
- After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbent paper.

NOTE: Do not allow the wells to become dry during the assay procedure. Washers must be rinsed with distilled water at the end of the test to avoid blockage and corrosion.

FULLY AUTOMATED MICROPLATE PROCESSORS

Contact your representative for details of currently available validated protocols. For instrumentation without established validated protocols, the following guidelines are recommended.

- For the first incubation, incubation times between 60 and 70 minutes (or 65 ± 5 minutes) may be programmed.

- For the 30 minute incubations, incubation times between 30 and 35 minutes (or 32.5 ± 2.5 minutes) may be programmed.
- Ensure all '**Analytical Precautions**' are followed. Protocols written following these guidelines must be fully validated prior to use according to local procedure.

RESULTS

CALCULATION OF RESULTS

Each plate must be considered separately when calculating and interpreting results of the assay.

Approved software may be used for calculation and interpretation of results.

Negative Control

If using duplicate Negative Controls calculate the mean.

Example:

$$\begin{aligned} \text{Well 1} &= 0.086, & \text{Well 2} &= 0.094, \\ \text{Total} &= 0.180 \\ \text{Mean} &= 0.180/2 = 0.090 \end{aligned}$$

Discard any Negative Control value which is >0.25.

Cut-off Value

Calculate the Cut-off value by adding 0.6 either to the Negative Control or to the mean of the Negative Control replicates (see above).

Example:

$$\begin{aligned} \text{Mean Negative Control} &= 0.090 \\ \text{Cut-off value} &= 0.090 + 0.600 = 0.690 \end{aligned}$$

QUALITY CONTROL

Results of an assay are valid if the following criteria for the controls are met:

Negative Control

The mean absorbance is less than 0.25.

Positive Control

The absorbance is more than 0.8 above the mean absorbance of the Negative Control.

Assays which do not meet these criteria should be repeated.

In the unlikely event of the results repeatedly failing to meet either the Quality Control criteria or the expected performance of the test, please contact your representative.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

Non-Reactive Results

Specimens giving an absorbance less than the Cut-off value are considered negative in the assay.

Reactive Results

Specimens giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off value are considered initially reactive in the assay. Such specimens must be repeated in duplicate using the original source. Specimens that are reactive in at least one of the repeat tests are considered repeatedly reactive and are presumed to contain antibody to HCV. Unless local procedures state otherwise these specimens must be further investigated.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Murex anti-HCV (version 4.0) has been determined by testing specimens from random blood donors, patients with known antibody to HCV, patients with diseases related to HCV and patients with diseases unrelated to HCV.

In addition, its performance on commercially available seroconversion panels has been evaluated.

1. **Donor Specimens**

A total of 8835 routine donor specimens were screened with Murex anti-HCV (version 4.0) in Europe and Australia.

In the study, 99.82% (8819/8835) of specimens were non-reactive, 0.18% (16/8835) were initially reactive and 0.12% (11/8835) were repeatedly reactive. None of the repeatedly reactive specimens have been confirmed as positive for the presence of antibody to HCV.

The specificity of Murex anti-HCV (version 4.0) on this population of presumed negative specimens is estimated to be 99.88% (8824/8835) with a 95% confidence interval of 99.77% (8815/8835) to 99.94% (8830/8835) by the binomial distribution.

2. Clinical Specimens

A total of 69 specimens with antibody to HCV, confirmed with an alternative immunoassay, Ortho RIBA3 and/or Western blot, were reactive with Murex anti-HCV (version 4.0).

A total of 27 commercially available HCV seroconversion panels were also tested with Murex anti-HCV (version 4.0). Comparison with an alternative commercially available immunoassay for the detection of antibody to HCV showed that Murex anti-HCV (version 4.0) detected antibody two bleeds earlier in four panels, one bleed earlier in three panels, one bleed later in three panels and at the same bleed in 17 panels.

In addition, 873 potentially cross-reactive specimens from patients with conditions unrelated to HCV infection, including other acute viral infections, antenatal, lipaemic, icteric and haemolysed specimens, were tested with Murex anti-HCV (version 4.0). A total of 869 of these specimens were non-reactive with Murex anti-HCV (version 4.0), the remaining four specimens included two which gave indeterminate results with Ortho RIBA3.

3. Assay Reproducibility

Five replicates of each of four specimens were tested on ten separate occasions with two separate lots to ascertain the reproducibility of Murex anti-HCV (version 4.0). The results of the study are summarised in Table 3 and Table 4

Table 3
Murex anti-HCV (version 4.0) - Assay Reproducibility (Lot 1)

Specimen	Number of Assays	Mean Absorbance/ Cut-off Value	Intra-assay %CV	Inter-assay %CV
1	10	4.03	2.9	3.9
2	10	3.9	4.6	5.2
3	10	2.33	3.1	6.9
4	10	0.14	3.9	10.2

Table 4
Murex anti-HCV (version 4.0) - Assay Reproducibility (Lot 2)

Specimen	Number of assays	Mean Absorbance/ Cut-off value	Intra-assay % CV	Inter-assay % CV
1	10	3.22	6.5	9.1
2	10	3.14	7.2	9.2
3	10	1.69	5.2	9.5
4	10	0.13	4.0	8.4

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The **Test Procedure** and **Interpretation of Results** must be followed.
 - This test has only been evaluated for use with individual (unpooled) serum, EDTA plasma, heparin plasma or citrate plasma specimens.
 - A non-reactive specimen result with an antibody detection test does not preclude the possibility of infection.
 - Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.
 - The most common sources of error are:
 - Imprecise delivery of Specimen, Conjugate or Substrate into the wells.
 - Contamination of Substrate with Conjugate.
 - Contamination with conjugates from other assays.
 - Blocked or partially blocked washer probes.
 - Insufficient aspiration leaving a small volume of Wash Fluid in the wells.
 - Failure to ensure that the bottom surface of the wells is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before a plate is read.
 - Failure to read at the correct wavelength or use of an incorrect reference wavelength.
 - The use of highly haemolysed specimens, incompletely clotted sera, plasma specimens containing fibrin or specimens with microbial contamination may give rise to erroneous results.
 - This test has not been evaluated for use with specimens from cadavers.
- See also '**Analytical Precautions**'.

BIBLIOGRAPHY

- Choo, Q.L., Kuo, G., et al., (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359.
- Miller, R.H. and Purcell, R.H. (1990).** Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci* 87, 2057.
- Weiner, A.J., Brauer, M.J. et al., (1991).** Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842.
- Jove, J., Sanchez-Tapias, J.M. et al., (1990).** Post-transfusional vs. sporadic non-A, non-B chronic hepatitis. A clinicopathological and evolutive study. *Liver*, 8, 42.
- Hopf, U., Möller, B. et al., (1990).** Long term follow up of post transfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *Hepatology*, 10, 69.
- Conroy-Cantilena, C. (1997).** Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. *Trends Biotech* 15, 71.
- Botte, C., Janot, C. (1996).** Epidemiology of HCV infection in the general population and in blood transfusion. *Nephrol Dial Transplant* 11 (Suppl 4), 19.
- Courouce, A.M. (1998).** Development of screening and confirmation tests for antibodies to Hepatitis C virus. Reesink, H.W. (ed) Hepatitis C virus – *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 62, 64, Basel, Karger.
- Centres for Disease Control. (1985).** Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, 34, No. 45, 681.

Bronidox® is not a trade mark of DiaSorin



DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123



DiaSorin Italia S.p.A.
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

D13DS47GB
July, 2022

Murex anti-HCV (version 4.0)

Imunofermentinis tyrimas, skirtas žmogaus serume arba plazmoje nustatyti antikūnus prieš hepatito C virusą (HCV)

Klientų aptarnavimas

Dėl papildomos informacijos apie produktą susisiekite su vietos klientų aptarnavimo organizacija.

Prieš naudojimą reikia atidžiai perskaityti šias naudojimo instrukcijas. Būtina tiksliai laikytis naudojimo instrukcijų. Esant nukrypimų nuo naudojimo instrukcijų tyrimo rezultatų patikimumo garantuoti negalima.

IVD

Pagrindiniai naudojami simboliai

REF	Sąrašo numeris	IVD	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisais
LOT	Serijos numeris		Laikyti 2–8°C temperatūroje
	Tinkamumo data		ATSARGIAI! žr. pridėtus dokumentus
	Gamintojas		Žr. naudojimo instrukcijas
			Saugoti nuo saulės šviesos

Reagento komponentų pavadinimuose naudojamų simbolių išsamų paaiškinimą žr. skyriuje **REAGENTAI**.

NUMATYTOJI PASKIRTIS

„Murex anti-HCV (version 4.0)“ – tai imunofermentinis tyrimas, skirtas žmogaus serume arba plazmoje nustatyti antikūnus prieš hepatito C virusą (HCV). Šio tyrimo paskirtis – padėti lengviau diagnozuoti ankstyvąją HCV infekcijos stadiją atliekant atrenkamąjį tikrinimą ir gydymo įstaigose.

TYRIMO SANTRAUKA IR AIŠKINIMAS

Hepatito C virusas (HCV) dabar laikomas pagrindine su kraujo perpylimu susijusio ne A ir ne B tipo hepatito priežastimi¹. HCV – tai vienos teigiamosios grandinės RNR virusas, panašus į flavivirusus ir pestivirusus^{2,3} bei paplitęs visame pasaulyje. Nors bendroji HCV infekcija paprastai pasireiškia lengvai, dažnai visai be klinikinių simptomų ir tik nuo 10% iki 25% pacientų atsiranda gelta, daugiau nei 50% infekuotų asmenų vystosi lėtinis hepatitas su sunkiomis ir kartais pavojingomis gyvybei pasekmėmis, pvz., ciroze ir hepatoceliuline karcinoma^{4,5}. HCV paplitimo tarp kraujo donorų įvertimai visame pasaulyje svyruoja nuo 0,5 iki 8%⁶, nors buvo stebėtas mažėjantis paplitimas gerėjant diagnostinių tyrimų jautrumui ir specifiškumui bei donorų atrankai. Duomenys rodo, kad paplitimas siekia nuo 0,1 iki 1,5% Europoje ir 0,6% JAV⁷.

HCV diagnozė priklauso nuo tiesioginio virusinės RNR nustatymo PCR metodu arba nustatant anti-HCV antikūnus. HCV RNR kilmės struktūrinių ir nestruktūrinių baltymų sukūrimui buvo naudojami rekombinaciniai DNR metodai, taikomi antikūnų prieš HCV aptikimo tyrimams. Anti-HCV tyrimai ištobulėjo: nuo pirmos kartos produktų, kuriuose naudojami tik NS4 baltymai, iki pat trečios kartos tyrimų, kuriuose naudojami šerdiniai (struktūriniai), NS3 proteazės / helikazės (nestruktūriniai), NS4 (nestruktūriniai) ir NS5 replikazės (nestruktūriniai) baltymai. Tyrimai rodo, kad trečiosios kartos tyrimams būdingas reikšmingai didesnis jautrumo padidėjimas, ypač dėl to, kad jis geriau reaguoja su NS3 antigenu ir dėl ankstyvesnio serokonversijos nustatymo⁸.

„Murex anti-HCV (version 4.0)“ tyrime naudojami antigenai iš viruso šerdinio, NS3, NS4 ir NS5 regionų. Antigenai buvo kruopščiai kuriami ir atrenkami, kad diagnostinis tyrimas būtų jautrus ir specifiškas.

PROCEDŪROS PRINCIPAS

Atliekant „Murex anti-HCV (version 4.0)“ tyrimą, praskiestas ėminys inkubuojamas mikrošulinėliuose, padengtuose stipriai išgrynintais antigenais, kuriuose yra sekos iš HCV šerdies, NS3, NS4 ir NS5 regionų. Pirmosios inkubacijos metu visi ėminyje esantys anti-HCV antikūnai prisijungs prie imobilizuotų antigenų. Po neprisijungusios medžiagos likučių išplovimo prisijungę anti-HCV antikūnai inkubuojami su monokloniniais IgG antikūnais prieš žmogų, sujungtais su peroksidaze. Antrosios inkubacijos metu konjugatas prisijungs prie antikūno, imobilizuoto pirmo etapo metu. Pašalinus konjugato perteklių, prisijungęs fermentas aptinkamas pridėjus tirpalo, kurio sudėtyje yra 3,3', 5,5' tetrametilbenzidino (TMB) ir vandenilio peroksido. Šulinėliai, kuriuose buvo reaguojantys su antikūnais prieš HCV ėminiai, nusidažys violetine spalva.

Fermentinė reakcija nutraukiama sieros rūgštimi ir gaunama oranžinė spalva, kurią galima nuskaityti fotometriniu būdu. Šulinėliuose esančio prisijungusio konjugato kiekis, ir taip pat spalva, tiesiogiai proporcingai susiję su antikūnų koncentracija ėminyje.

REAGENTAI

APRAŠYMAS, PARUOŠIMAS NAUDOTI IR REKOMENDUOJAMOS LAIKYMO SĄLYGOS

Taip pat žr. skyrių „Išpėjimai ir atsargumo priemonės“.



Visus komponentus reikia laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje, jei nenurodyta kitaip; tokiais sąlygomis jie išlieka aktyvūs iki rinkinio tinkamumo naudoti datos.

COATED WELLS

1. Dengti šulinėliai

Viena plokštelė (7F5156) arba penkios plokštelės (7F5157); kiekviena jų sudaryta iš 96 mikrošulinėlių, dengtų išgrynintais HCV antigenais.

Prieš išimdami iš maišelio palaukite, kol šulinėliai sušils iki temperatūros nuo 18 iki 30°C. Jeigu naudojama ne visa plokštelė, nepanaudotas juosteles vėl supakuokite originaliame plėvelės maišelyje arba pateiktame plastikiniame užsegamame maišelyje kartu su sausiklio maišeliu, ir padėkite laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje ne ilgiau nei 6 mėnesius po pirmojo atidarymo.

SAMPLE DIL

2. Mėginių skiediklis

Vienas 20 mL buteliukas (7F5156) arba vienas 100 mL buteliukas (7F5157) su buferiu, kuriame yra galvijų kilmės baltymų. Sudėtyje yra konservantų 0,05% „Bronidox“ ir 0,1% natrio azido.

CONTROL – ⚠

3. Neigiama kontrolės medžiaga

Vienas buteliukas, kuriame yra 0,8 mL sveiko žmogaus serumo, praskiesto buferiniame tirpale, kuriame yra galvijų kilmės baltymo. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „Bronidox“.

CONTROL + ⚠

4. Antikūnų prieš HCV teigiama kontrolės medžiaga

Vienas buteliukas, kuriame yra 0,6 mL išaktyvinto žmogaus serumo, kuriame yra antikūnų prieš HCV, praskiestų buferiniame tirpale, kuriame yra galvijų kilmės baltymo. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „Bronidox“.

CONJUGATE DIL

5. Konjugato skiediklis

Vienas buteliukas (7F5156) arba trys buteliukai (7F5157), kuriame (-iuose) yra 20 mL buferinio tirpalo, kurio (-ių) sudėtyje yra neorganinių druskų ir galvijų baltymo su 0,05% konservanto „Bronidox“.

CONJUGATE



6. Konjugatas

Vienas buteliukas (7F5156) arba trys buteliukai (7F5157), kuriame (-iuose) yra išdžiovintų užšaldant krienų peroksidaze žymėtų pelių monokloninių antikūnų prieš žmogaus IgG galvijų baltymų terpėje, kurių kiekio užtenka atlikti 192 tyrimus.

Kad visiškai ištirptų, paruoškite mažiausiai 15 minučių prieš naudojimą. Konjugato skiediklio buteliuką palaikykite kambario temperatūroje. Atsargiai pabelskite konjugato buteliuką į stalą, kad pasišalintų prie guminio kamščio prilipusios medžiagos. Atsargiai atkimškite ir konjugato skiediklį įpilkite į buteliuką. Vėl užkimškite ir palikite pastovėti retkarčiais pamaišydami ir pavartydami.

Paruoštą tirpalą laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje ne daugiau nei septynias dienas arba, padaliję dalimis ir užšaldę (–15°C arba žemesnėje temperatūroje) – ne ilgiau nei šešis mėnesius. Paruoštą konjugatą galima užšaldyti ir atšildyti ne daugiau nei keturis kartus. Saugoti nuo saulės šviesos.

SUBSTRATE	DIL
-----------	-----

7. Substrato skiediklis

Vienas buteliukas, kuriame yra 35 mL bespalvio trinitratro citrato ir vandenilio peroksido tirpalo.

SUBSTRATE	CONC
-----------	------

8. Substrato koncentratas

Vienas buteliukas, kuriame yra 35 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) ir stabilizatorių rožiniame tirpale.



Substrato tirpalas

Norėdami paruošti substrato tirpalą, bespalvio substrato skiediklio pripilkite į tokio paties tūrio rožinį substrato koncentratą švarioje stiklinėje arba plastikiniame inde. **Svarbu laikytis šios įpylimo eilės tvarkos, o visos pipetės ir stikliniai indai, naudojami ruošti substrato tirpalą, turi būti švarūs.**

Kitais substrato tirpalą galima pagaminti supilant visą substrato skiediklio buteliuko turinį į substrato koncentrato buteliuką. Iš vieno substrato tirpalo buteliuko gaunamo reagento pakanka mažiausiai penkioms plokštelėms – žr. 1 lentelę.

1 lentelė

Reikiamas substrato koncentrato ir substrato skiediklio tūris

Šulinėlių skaičius	Plokštelių skaičius
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88	1 2 3 4
Substrato koncentratas (mL)	
1,0 1,5 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 5,0	6 12 18 22
Substrato skiediklis (mL)	
1,0 1,5 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 5,0	6 12 18 22

Naudojant su automatinėmis sistemomis gali reikėti papildomo reagento. Saugoti nuo visų natūralios ir dirbtinės šviesos šaltinių. Substrato tirpalas turi būti rožinis; jeigu prieš naudojimą jis violetinis, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą.

Vietoj paruošto šio rinkinio substrato tirpalo galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio, kuriam naudojamas rožinis substrato koncentratas, tirpalą. Užtikrinkite, kad substrato tirpalas būtų ruošiamas iš viename rinkinyje esančių substrato skiediklio ir substrato koncentrato.

Paruoštas substrato tirpalas, laikomas šaldytuve (nuo 2 iki 8°C temperatūroje) arba nuo 15 iki 25°C temperatūroje, išlieka stabilus ne daugiau nei dvi dienas, tačiau jį reikia išmesti, jeigu susidaro kristalų.

WASH	FLUID
------	-------

9. Plovimo skystis

Vienas (7F5156) arba du buteliukai (7F5157), kuriame (-uose) yra 125 mL 20 kartų didesnio nei darbinis stiprumo glicino ir borato plovimo skysčio. Sudėtyje yra 0,2% konservanto „Bronidox®“.

Vieną dalį koncentruoto plovimo skysčio įpilkite į 19 dalių distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad gautumėte reikiamą tūrį, arba praskieskite visą vieno plovimo skysčio buteliuko turinį, kad gautumėte 2500 mL galutinio tirpalo. Plovimo skysčio koncentrate gali būti kristalų, tačiau šie kristalai ištirps, kai plovimo skystis bus praskiestas iki darbinio stiprumo. Praskiestame plovimo skystyje yra 0,01% konservanto „Bronidox®“.

Vietoj šio rinkinio plovimo skysčio galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio glicino ir borato plovimo skystį.

Darbinio stiprumo plovimo skystį laikykite 18 - 30°C temperatūroje uždaramame inde. Tokiomis sąlygomis jis išliks aktyvus vieną mėnesį.

PASTABA. Laikymo metu plovimo skystis gali pagelsti. Tai neturės įtakos tyrimo atlikimui, jeigu visas plovimo skystis bus išsiurbiamas iš šulinėlių.

PASTABA. Kitų rinkinių substrato tirpalą ir plovimo skystį naudoti galima, tačiau jų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo datai, atspausdintai ant komponentų etiketės.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

IVD

Reagentai skirti tik *in vitro* diagnostikai.

Tik profesionaliam naudojimui.

Informaciją apie potencialiai pavojingus komponentus galite rasti gamintojo saugos duomenų lape ir gaminio žymėjime.

SVEIKATOS IR SAUGOS INFORMACIJA



ATSARGIAI: šiame rinkinyje yra žmonių kilmės komponentų.

Gamybai naudojamas žmonių serumas buvo patikrintas ir nustatytas jo reagavimas arba nereagavimas su analitėmis, kaip nurodyta 2 lentelėje toliau.

2 lentelė

Komponentas	Reagavo su	Nereagavo su
Neigijama kontrolės medžiaga	Netaikoma	antikūnais prieš HCV, ŽIV (1 ir 2 tipo) ir HBsAg
Teigijama kontrolės medžiaga	antikūnais prieš HCV	HBsAg ir antikūnais prieš ŽIV (1 ir 2 tipo)

Prieš naudojant reagento ruošimui, visi naudojami reagavę serumo mėginiai buvo išaktyvinti, tačiau visas žmonių kilmės medžiagas reikia laikyti potencialiai infekcinėmis ir su šiuo rinkiniu bei tiriamaisiais bandiniais reikia dirbti laikantis nustatytų gerosios laboratorijų patirties taisyklių.

Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) 1272/2008 (CLP), pavojingi reagentai klasifikuojami ir pažymėti, kaip nurodyta toliau:

REAGENTAI:	WASH FLUID
SIGNALINIS ŽODIS:	EUH210 saugos duomenų lapą galima gauti paprašius.
SIMBOLIAI / PIKTOGRAMOS:	---
PAVOJINGUMO FRAZĖS:	---
ATSARGUMO FRAZĖS:	---
SUDĖTIS:	---

REAGENTAI:	SUBSTRATE CONC
SIGNALINIS ŽODIS:	Įspėjimas
SIMBOLIAI / PIKTOGRAMOS:	
PAVOJINGUMO FRAZĖS:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą.
ATSARGUMO FRAZĖS:	---
SUDĖTIS:	P264 po naudojimo kruopščiai nuplauti rankas. P280 mėvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra, ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

REAGENTAI:	SAMPLE DIL
SIGNALINIS ŽODIS:	---
SIMBOLIAI / PIKTOGRAMOS:	---
PAVOJINGUMO FRAZĖS:	EUH032 kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas.
ATSARGUMO	
FRAZĖS:	---
SUDĖTIS:	---

REAGENTAI:	CONTROL + 
SIGNALINIS ŽODIS:	EUH210 saugos duomenų lapą galima gauti paprašius.
SIMBOLIAI / PIKTOGRAMOS:	---
PAVOJINGUMO FRAZĖS:	---
ATSARGUMO	---
FRAZĖS:	---
SUDĖTIS:	---

Papildomą informaciją žr. saugos duomenų lapę, kurį galima rasti www.diasorin.com.

- Medžiagas, kurios galėjo būti užterštos, reikia šalinti saugiai pagal vietas reikalavimus.
- Išsiliejus medžiagoms, kurios gali būti infekcinės, jas reikia nedelsiant surinkti absorbuojančio popieriaus audeklu, o užterštą vietą prieš tęsiant darbą reikia nuvalyti, pvz., 1,0% natrio hipochloritu⁹. Išsiliejus medžiagoms su rūgštimi, natrio hipochlorito naudoti negalima, prieš tai sausai nenušluosčius išsiliejimo vietas. Išsiliejusioms medžiagoms valyti naudojamos priemonės, įskaitant pirštines, turi būti utilizuojamos kaip atliekos, kurios gali būti biologiškai pavojingos. Neautoklavuokite medžiagų, kurių sudėtyje yra natrio hipochlorito.
- Neutralizuotas rūgštis ir kitas skystas atliekas reikia nukensminti pridėdant pakankamą kiekį natrio hipochlorito, kad galutinė koncentracija būtų ne mažesnė nei 1,0%. Kad nukensminimas būtų veiksmingas, gali reikėti palikti 1,0% natrio hipochlorito tirpalą suveikti 30 minučių.
- Nepipetuoti burna. Naudodami mėginius ir atlikdami tyrimą dėvėkite vienkartinės pirštines ir akių apsaugą. Baigus darbą kruopščiai nusiplaui rankas.
- Šių reagentų sudėtyje yra nedidelės koncentracijos kenksmingų medžiagų:
 - mėginių skiediklyje yra saponino ir detergentų.
- Stabdymo tirpalui naudojama sieros rūgštis ir stiklinėms priemonėms plauti naudojama druskos rūgštis išdina ir jas reikia naudoti atitinkamai atsargiai. Jeigu kurios nors iš jų pateko ant odos arba į akis, kruopščiai nuplaukite vandeniu.
- Jeigu kurio nors reagento pateko ant odos arba į akis, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.

ANALIZĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Pasibaigus nurodytam galiojimo terminui, reagentų nenaudokite. Reikia vengti mikrobiologinio reagentų užteršimo, nes tai gali sumažinti produkto naudojimo laiką ir galima gauti klaidingus rezultatus.
- Nekeiskite tyrimo procedūros ir nepakeiskite reagentų kitų gamintojų arba kitos partijos reagentais, nebent nurodyta, kad reagentus galima keisti vienus kitais. Netrumpinkite nurodytos inkubacijos trukmės.
- Prieš naudojimą visus reagentus ir ėminius palaikykite nuo 18 iki 30°C temperatūroje. Iškart po naudojimo visus reagentus grąžinkite į rekomenduojamą laikymo temperatūrą.
- Su reagentais naudojamas stiklinės priemonės reikia kruopščiai išplauti 2M druskos rūgštimi ir paskui išskalauti distiliuotu arba labai aukštos kokybės dejonizuotu vandeniu.
- Nelaikykite reagentų ir ėminių šaldikliuose su automatinio atitirpinimo funkcija.
- Laikymo metu ar inkubacijos etape reagentų neveikite ryškia šviesa ar hipochlorito garais.

- Tyrimo procedūros metu neieškite šulinėliams išdžiūti.
- Nemaišykite vieno reagentų su kitais. „Murex“ analizės substrato tirpalui naudokite atskirą pipetę. Taip pat atskirą pipetę reikia skirti naudoti su konjugatu.
- Nepalieskite ir neaptašykite šulinėlio krašto konjugatu. Nepūskite skysčių iš mikropipetės; jeigu įmanoma, rekomenduojama naudoti reversinį pipetavimą.
- Prieš nuskaitydami plokštelę patikrinkite, ar plokštelės dugnas švarus ir sausas, ar skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
- Neužterškite mikrošulinėlių dulkelėmis nuo vienkartinį pirštinių.
- Visiškai automatinį mikroplokštelių procesorių naudojimas
 - nebūtina naudoti plokštelių dangtelių ir nusausti šulinėlių;
 - neleiskite visiškai automatinį mikroplokštelių procesorių sistemos skysčiams užteršti ėminių arba reagentų;
 - tikrinant visiškai automatinį procesorių tyrimus reikia atmesti kryžminio tyrimų susimaišymo galimybę;
- Reikia atsižvelgti į galimą kryžminį tyrimų užteršimą vertinant tyrimo protokolus automatinėms mikroplokštelių procesoriams.
- Užtikrinkite, kad tyrimas būtų atliekamas temperatūros ribose, nurodytose tyrimo protokole.
- Nenaudokite CO₂ inkubatorių.
- Nelaikykite stabdymo tirpalo sekliaje inde ir po naudojimo nesusipilkite jo atgal į atsargų buteliuką.
- Svarbu, kad ėminiai ir kontroliniai mėginiai būtų kruopščiai sumaišyti su mėginio skiedikliu, antraip galima gauti klaidingus rezultatus. Tinkamai išmaišyti galima:
 - rankiniu būdu maišant pipete aukštyn ir žemyn mažiausiai keturis kartus, kai pilami ėminiai ar kontrolės medžiagos;
 - 30 sekundžių uždėjus plokštelę ant mikroplokštelių plaktuvo 800 suk./min. greičiu.
 Naudojant automatinis ėminių dalytuvus gali būti patogiau į šulinėlius įpilti 90 µL mėginių skiediklio, paskui 20 µL mėginio, o paskui likusius 90 µL mėginių skiediklio. Ši procedūra užtikrins tinkamą išmaišymą.
- Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimo su instrumentais protokoliai.

BANDINIŲ ĖMIMAS, TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

BANDINIŲ ĖMIMAS

Galima naudoti serumo, plazmos su EDTA, plazmos su citratu arba plazmos su heparinu ėminius. Iš venos paimtam kraujui reikia leisti sukrešėti natūraliai. Užtikrinkite, kad serumo ėminiai būtų visiškai sukrešę. Centrifuguodami iš ėminio pašalinkite visas matomas daleles.

Jeigu ėminiai paruošti naudojant skystus antikoagulantus, pvz., citruotą plazmą, reikėtų pagalvoti apie praskiedimo poveikį.

BANDINIŲ TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

Ėminius laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje. Tyrimui nereikalingus ėminius reikia atskirti nuo krešulio arba ląstelių agregato ir laikyti užšaldytus (-15°C arba žemesnėje temperatūroje). Venkite daugkartinių užšaldymo ir atitirpinimo ciklų. Atitirpinę užtikrinkite, kad ėminiai prieš tyrimą būtų kruopščiai išmaišyti.

PROCEDŪRA

REIKALINGOS, BET NEPATEIKIAMOS MEDŽIAGOS

- Stabdymo tirpalas (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgštis)**, pvz., nuo 3 mL (0,5M tirpalui) iki 11 mL (2,0M tirpalui) laboratorinės paskirties koncentruotos sieros rūgšties (18,0 M) įpilkite į maždaug 80 mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens, paskui papildykite vandens iki 100 mL bendrojo tūrio. Kitas būdas – galima naudoti šį reagentą: 1N sieros rūgštis, kodas N0165 (1 flakono pakuotė) arba kodas N0164 (15 flakonų pakuotė).
- Plovimo skysčiui praskiesti, stabdymo tirpalui paruošti ir naudoti kartu su automatinėmis plovyklėmis reikia **šviežiai distiliuoto arba aukštos kokybės dejonizuoto vandens**.
- Atitinkamo tūrio **mikropipetės ir daugiakanalės mikropipetės**.
- Inkubatorius**, galintis palaikyti tyrimo protokole nurodyto diapazono temperatūrą.
- Forminis šildymo blokas** (kodas 5F09-02). Skirtas naudoti laboratorijos inkubatoriuose. Geriausia forminį šildymo bloką laikyti naudojamame inkubatoriuje. Jeigu tai neįmanoma, jį reikia įdėti į inkubatorių ne mažiau nei keturias valandas iki tyrimo pradžios.
- Instrumentai**
 - automatinis mikroplokštelių juostelių plovimo įtaisas;
 - mikroplokštelių skaitytuvas arba
 - visiškai automatinis mikroplokštelių procesorius.
 Prieš naudojimą reikia patikrinti visų instrumentų tinkamumą naudoti.

Išsamios informacijos apie rekomenduojamas instrumentų ir tinkamumo įvertinimo procedūrų sistemas ir programinės įrangos protokolus kreipkitės į vietos atstovybę.

- Vienkartiniai reagentų loveliai.** (Kodo Nr. 5F24-01).
- Natrio hipochloritas** nukenksminimui. (Žr. skyrių „Sveikatos ir saugos informacija“).

TYRIMO PROCEDŪRA

Prieš atlikdami tyrimą atidžiai perskaitykite skyrių „**Analizės atsargumo priemonės**“.

Įvairių tyrimo komponentų įpylimą į akutes galima patvirtinti patikrinant plokštelės spalvas.

Mėginių skiediklis būna žaliai rudos spalvos. Pridėjus ėminio arba kontrolės medžiagos, spalva pasikeis į mėlynai žalią. Skirtingų ėminių spalvos kis įvairiai, tačiau visada turi būti matomos pokytis.

Konjugatas būna rudos spalvos.

Substrato tirpalas iš pradžių būna rožinis, o teigiamuose šulinėliuose tampa violetinis. Pridėjus **stabdymo tirpalo** teigiamai sureagavusių violetinė spalva pasikeis į oranžinę, o neigiamųjų – išliks rožinė.

Ar įpilta ėminio arba reagento galima patvirtinti naudojant mikroplokštelių skaitytuvą: mėginių skiediklis su ėminiu nuskaitomas 620 nm arba 570 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), konjugatas nuskaitomas 410 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), o substrato tirpalas – 490 nm bangų ruože (referencijos nėra).

PUSIAU AUTOMATINIS APDOROJIMAS

1 veiksmas	Konjugatą praskieskite konjugato skiedikliu ir paruoškite substrato tirpalą bei praskieskite plovimo skystį .	
2 veiksmas	Naudokite tik tyrimui būtiną juostelių kiekį .	
3 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 180 µL mėginių skiediklio .	180 µL
4 veiksmas	Į šulinėlius įpilkite 20 µL ėminių arba kontrolės medžiagų . Jeigu naudojate dvi juosteles arba mažiau, vieną neigiamos kontrolės mėginį pipete įlašinkite į šulinėlį A1, o vieną teigiamos kontrolės mėginį – į šulinėlį B1. Jeigu naudojate daugiau nei dvi juosteles, rekomenduojama įpilti neigiamos kontrolės medžiagos į du šulinėlius, siekiant papildomo saugumo. Padalinę ėminius, kontrolės medžiagas įpilkite į tam skirtus šulinėlius kiekvienoje plokštelėje. Baltame fone bus lengviau matyti, kad įpilta ėminio. Ėminius ir kontrolės medžiagas reikia kruopščiai sumaišyti su mėginių skiedikliu.	20 µL
5 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 1 valandą 37°C (±1°C) temperatūroje.	1 val.
6 veiksmas	Baigus inkubacijos laikotarpiui plokštelę išplaukite , kaip aprašyta skyriuje „ Plovimo procedūros “.	
7 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL konjugato .	100 µL
8 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C (± 1°C) temperatūroje.	30 min
9 veiksmas	Baigus inkubacijos laikotarpiui plokštelę išplaukite, kaip aprašyta skyriuje „ Plovimo procedūros “.	
10 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL substrato tirpalo .	100 µL
11 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite lygiai 30 minučių 37°C (± 1°C) temperatūroje, kol išryškės spalva. Saugokite nuo tiesioginės saulės šviesos. Šulinėliai, kuriose yra reaguojančių ėminių, turi nusidažyti violetine spalva.	30 min
12 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL stabdymo tirpalo (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgšties).	50 µL
13 veiksmas	Per 15 minučių išmatuokite sugertį 450 nm bangose, jeigu įmanoma, nustatę referencinį bangos ilgį nuo 620 nm iki 690 nm. Atlikite tuščiąjį matavimą instrumentu ore (be plokštelės laikiklyje).	450 nm

PLOVIMO PROCEDŪROS

Vietos atstovybėje galite gauti rekomenduojamų ploviklių protokolus ir ploviklių bei analizatorių tikrinimo procedūrų protokolus. Rekomenduojama naudoti šį protokolą:

a) **Automatinės mikroplokštelių juostų plovyklės protokolas**

Atlikite 5 plovimo ciklus naudodami darbinio stiprumo plovimo skystį. Jeigu įmanoma užtikrinkite, kad:

- su „DiaSorin“ tiekiamais instrumentais būtų naudojama 500 µL/šulinėliui užpildymo tūrio pratekančioji plovimo srovė. Jeigu naudojami kiti instrumentai, su kuriais tai neįmanoma, užtikrinkite, kad šulinėlis būtų visiškai užpildytas;
- įpylimo aukštis būtų nustatytas taip, kad užpildytų visą šulinėlį su nedideliu teigiamu paviršiaus išsipūtimu, bet be perpildos;
- vienas įsiurbimo / plovimo / mirkymo ciklas truktų maždaug 30 sekundžių;
- užtikrinkite, kad šulinėlyje neliktų skysčio (jeigu galima, pabaigos cikle atlikite du įsiurbimo veiksmus);
- baigę plovimą apverskite plokštelę ir nuvarvinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.

PASTABA. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.

Baigus tyrimą plovyklės reikia išskalauti distiliuotu vandeniu, kad neužsikimštų ir nevyktų korozija.

VISIŠKAI AUTOMATINIAI MIKROPLOKŠTELIŲ PROCESORIAI

Išsamios informacijos apie šiuo metu esančius įvertinto tinkamumo protokolus kreipkitės į vietos atstovybę. Jeigu naudojate instrumentus, neturinčius protokolų, kurių tinkamumas įvertintas, rekomenduojama laikytis šių nurodymų.

- Pirmajai inkubacijai galima suprogramuoti nuo 60 iki 70 minučių (arba 65 (±5) minučių) inkubacijos trukmę.
- 30 minučių trukmės inkubacijai galima suprogramuoti nuo 30 iki 35 minučių (arba 32,5 (±2,5) minučių) inkubacijos trukmę.
- Užtikrinkite, kad būtų laikomasi visų skyriaus „**Analizės atsargumo priemonės**“ nuorodų. Prieš naudojimą pagal vietoje nustatytą procedūrą reikia atidžiai įvertinti sudarytų protokolų tinkamumą pagal šias gaires.

REZULTATAI

REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS

Skaičiuojant ir interpretuojant tyrimo rezultatus kiekvieną plokštelę reikia analizuoti atskirai.

Rezultatams apskaičiuoti ir interpretuoti reikia naudoti patvirtintą programinę įrangą.

Neigiama kontrolės medžiaga

Jeigu naudojate du neigiamos kontrolės šulinėlius, apskaičiuokite vidurkį. Pavyzdys.

$$\begin{aligned} 1 \text{ šulinėlis} &= 0,086; & 2 \text{ šulinėlis} &= 0,094; \\ \text{Iš viso} &= 0,180 \\ \text{Vidurkis} &= 0,180/2 &= 0,090 \end{aligned}$$

Atmeskite neigiamos kontrolės vertę, kuri >0,25.

Kirpinio vertė

Apskaičiuokite kirpinio vertę, prie neigiamos kontrolės kartotinių arba neigiamos kontrolės verčių vidurkio pridėdami 0,6 (žr. aukščiau).

Pavyzdys.

$$\begin{aligned} \text{Neigiamos kontrolės} &= 0,090 \\ \text{verčių vidurkis} & \\ \text{Kirpinio vertė} &= 0,090 + 0,600 = 0,690 \end{aligned}$$

KOKYBĖS KONTROLĖ

Tyrimo rezultatai galioja, jeigu atitinka šiuos kontrolės kriterijus:

Neigiama kontrolės medžiaga

Sugerties vidurkis mažesnis nei 0,25.

Teigiama kontrolės medžiaga

Sugerties vidurkis didesnis už neigiamos kontrolės medžiagos sugerties vidurkį daugiau nei 0,8.

Tyrimus, kurie neatitinka šių kriterijų, reikia pakartoti.

Nors tai mažai tikėtina, bet jeigu rezultatai kartotinai neatitinka kokybės kontrolės kriterijų arba tikėtino tyrimo funkcionalumo, kreipkitės į vietos atstovybę.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Nereagavę rezultatai

Ėminiai, kurių sugertis mažesnė už kirpinio vertę, tame tyrime laikomi neigiamais.

Reagavę rezultatai

Ėminiai, kurių sugertis lygi arba didesnė už kirpinio vertę, laikomi pradiniai reagavusiais. Tokius ėminius reikia kartotinai iširti du kartus naudojant originalų šaltinį. Ėminiai, kurie reaguoja bent viename iš dviejų kartotinių tyrimų, laikomi kartotinai reagavusiais ir daroma prielaida, kad juose yra antikūnų prieš HCV antigenus. Jei vietos procedūrose nenurodyta kitaip, šiuos ėminius reikia tirti toliau.

SPECIFINĖS FUNKCIONALUMO SAVYBĖS

„Murex anti-HCV (version 4.0)“ funkcionalumas nustatytas tiriant ėminius iš atsitiktinių kraujo donorų; pacientų, kuriems nustatyta antikūnų prieš HCV; pacientų, sergančių ligomis, susijusiomis su HCV; ir pacientų, sergančių ligomis, nesusijusiomis su HCV, mėginius.

Be to, jo funkcionalumas buvo vertinamas naudojant rinkoje esančius serokonversijos panelius.

1. Donorų ėminiai

Naudojant „Murex anti-HCV (version 4.0)“ buvo patikrinti iš viso 8835 įprastinių donorų ėminiai Europoje ir Australijoje.

Šiame tyrime 99,82% (8819/8835) ėminių nereagavo; 0,18% (16/8835) pradiniai reagavo, o 0,12% (11/8835) reagavo kartotinai. Nė vienas iš kartotinai reagavusių ėminių nebuvo patvirtintas kaip teigiamas, t. y., kuriame esama antikūnų prieš HCV.

Apskaičiuotasis „Murex anti-HCV (version 4.0)“ specifinis tikėtinais neigiamų ėminių grupėje yra 99,88% (8824/8835), o binominio skirstinio 95% pasikliaudies intervalas yra nuo 99,77% (8815/8835) iki 99,94% (8830/8835).

2. Klinikiniai ėminiai

Iš viso 69 ėminiai su antikūnais prieš HCV, kurių tyrimų rezultatai buvo patvirtinti alternatyviais imunofermentiniais tyrimais, „Ortho RIBA3“ ir (arba) „Western blot“, reagavo su „Murex anti-HCV (version 4.0)“. Taip pat su „Murex anti-HCV (version 4.0)“ buvo iširti iš viso 27 rinkoje esantys HCV serokonversijos paneliai. Palyginus su kitais rinkoje esančiais antikūnų prieš HCV nustatymo imunofermentiniais tyrimais paaiškėjo, kad su „Murex anti-HCV (version 4.0)“ antikūnų keturiuose paneliuose buvo aptikta dviem kraujo ėmimais anksčiau, trijuose paneliuose – vienu kraujo ėmimu anksčiau, trijuose paneliuose – vienu kraujo ėmimu vėliau ir 17 panelių – tuo pačiu metu.

Be to, naudojant „Murex anti-HCV (version 4.0)“ buvo iširti 873 potencialiai kryžmiškai reaguojantys ėminiai, paimti iš pacientų, turinčių su HCV infekcija nesusijusių sutrikimų, įskaitant kitas ūmines virusines infekcijas, antenatalinius, lipeminius, ikterinius ir hemolizuotus ėminius. Iš šių ėminių su „Murex anti-HCV (version 4.0)“ nereagavo viso 869 ėminiai, o keturių likusių ėminių du liko neaiškūs ir ištyrus „Ortho RIBA3“.

3. Tyrimo atkuriamumas

Siekiant patvirtinti „Murex anti-HCV (version 4.0)“ atkuriamumą, kiekvienas iš keturių ėminių buvo iširtas atlikus po penkis kartotinius dešimčia atskirų atvejų, naudojant dviejų skirtingų serijų reagentus. Tyrimo rezultatų suvestinė pateikiama 3 ir 4 lentelėse

3 lentelė

„Murex anti-HCV (version 4.0)“. Tyrimo atkuriamumas (1 serija)

Bandinys	Tyrimų skaičius	Sugerties vidurkis / kirpinio vertė	Atliekant vieną tyrimą, VK (%)	Atliekant kelis tyrimus, VK (%)
1	10	4,03	2,9	3,9
2	10	3,9	4,6	5,2
3	10	2,33	3,1	6,9
4	10	0,14	3,9	10,2

4 lentelė

„Murex anti-HCV (version 4.0)“. Tyrimo atkuriamumas (2 serija)

Bandinys	Tyrimų skaičius	Sugerties vidurkis / kirpinio vertė	Atliekant vieną tyrimą, VK, %	Atliekant kelis tyrimus, VK %
1	10	3,22	6,5	9,1
2	10	3,14	7,2	9,2
3	10	1,69	5,2	9,5
4	10	0,13	4,0	8,4

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

1. Būtina laikytis skyriuose „Tyrimo procedūra“ ir „Rezultatų interpretavimas“ pateiktų nuorodų.
2. Tyrimas buvo įvertintas tik naudojant atskirų individų (ne jungtinio) serumo, plazmos su EDTA, plazmos su heparinu arba plazmos su citratu ėminius.
3. Kaip nereagavę ėminiai nustatyti antikūnų tyrimo rezultatai neatmeta infekcijos galimybės.
4. Teigiamus rezultatus, kurių negalima pakartoti, galima gauti atliekant bet kurią EIA procedūrą.
5. Dažniausi klaidų šaltiniai:
 - a) netikslus ėminio, konjugato arba substrato įpylimas į šulinėlius;
 - b) substrato užteršimas konjugatu;
 - c) užteršimas konjugatais iš kitų tyrimų;
 - d) užsikimšę arba iš dalies užsikimšę plovyklės zondai;
 - e) nepakankamas įsiurbimas, dėl ko šulinėliuose liko nedidelis kiekis plovimo skysčio;
 - f) prieš plokštelės nuskaitymą nepatikrinus, ar šulinėlių dugnas švarus bei sausas ir ar šulinėliuose esančio skysčio paviršiuje nėra burbuliukų;
 - g) nuskaitymas nustačius netinkamo ilgio bangas arba netinkamo ilgio referencines bangas.
6. Naudojant labai hemolizuotus ėminius, ne visiškai sukrešėjusį serumą, plazmos ėminius su fibrinu arba mikrobiologiškai užterštus ėminius gali padaugėti klaidingų rezultatų.
7. Šis tyrimas nebuvo įvertintas dėl galimybės naudoti tiriant lavonų ėminius.

Dar žr. skyrių „Analizės atsargumo priemonės“.

LITERATŪRA

1. Choo, Q.L., Kuo, G., et al., (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359.
2. Miller, R.H. and Purcell, R.H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci* 87, 2057.
3. Weiner, A.J., Brauer, M.J. et al., (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 180, 842.
4. Jove, J., Sanchez-Tapias, J.M. et al., (1990). Post-transfusional vs. sporadic non-A, non-B chronic hepatitis. A clinicopathological and evolutive study. *Liver*, 8, 42.
5. Hopf, U., Möller, B. et al., (1990). Long term follow up of post transfusion and sporadic chronic hepatitis non-A, non-B and frequency of circulating antibodies to hepatitis C virus (HCV). *Hepatology*, 10, 69.
6. Conroy-Cantilena, C. (1997). Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. *Trends Biotech* 15, 71.
7. Botte, C. Janot, C. (1996). Epidemiology of HCV infection in the general population and in blood transfusion. *Nephrol Dial Transplant* 11 (Suppl 4), 19.
8. Courouce, A.M. (1998). Development of screening and confirmation tests for antibodies to Hepatitis C virus. Reesink, H.W. (ed) Hepatitis C virus – *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 62, 64, Basel, Karger.
9. Centres for Disease Control. (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, 34, No. 45, 681.

„Bronidox“ nėra bendrovės „DiaSorin“ prekių ženklas

 DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford, DA1 5LR
UK



 DiaSorin Italia S.p.A.
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

D13DS47LT
2022 m. liepos mėn.

Revised July, 2022

Murex anti-HBc (total)

Enzyme immunoassay for the detection of antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) in human serum or plasma

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of anti-HBc or as an aid to the diagnosis of HBV infection.

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

This instructions for use must be read carefully prior to use. The instructions for use must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions for use.

IVD

Key to symbols used			
	List Number		<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
	Lot Number		Store at 2-8°C
	Expiration Date		CAUTION: Consult accompanying documents
	Manufacturer		Consult instructions for use
			Keep away from sunlight

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.

INTENDED USE

Murex anti-HBc (total) is intended for the detection of antibodies to hepatitis B core antigen (anti-HBc) in human serum or plasma.

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of anti-HBc or as an aid to the diagnosis of HBV infection.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Murex anti-HBc (total) is a competitive enzyme immunoassay for the detection of antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc). Anti-HBc titres increase rapidly after exposure to HBV¹ and can persist for many years at lower titres after clearance of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and resolution of infection². The presence of anti-HBc is therefore indicative both of past exposure to HBV and infection in the acute/chronic period. During active infection both immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin G (IgG) anti-HBc are usually present and these may be the only serological markers of HBV infection during the "window period" when HBsAg has cleared but before antibodies to HBsAg are detectable³. Murex anti-HBc (total) detects IgG and IgM antibodies to hepatitis B core antigen.

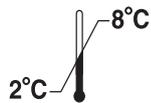
PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Murex anti-HBc (total) is based on microwells coated with recombinant hepatitis B core antigen (HBcAg). Samples and controls are incubated in the wells and any anti-HBc present in the sample or control binds to the HBcAg. Any excess antibody is then removed by washing. Conjugate (monoclonal anti-HBc conjugated to horseradish peroxidase) is then added to the wells. A second incubation is carried out during which the conjugate binds to any HBcAg on the well surface not blocked by anti-HBc from the test sample. After washing to remove any unbound conjugate, a solution containing 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added to the wells. Wells which do not contain anti-HBc and therefore bind conjugate, will develop a blue/green colour which is converted to orange when the enzyme reaction is stopped with sulphuric acid. The intensity of colour can be determined spectrophotometrically. The intensity of colour is greatest in the absence of anti-HBc and falls with increasing concentrations of anti-HBc in the sample.

REAGENTS

DESCRIPTION, PREPARATION FOR USE AND RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS

See also **Warnings and Precautions**.



All components must be stored at 2 to 8°C, unless otherwise stated, under which condition they will retain activity until the expiry date of the kit.

COATED WELLS 1. Coated Wells

One plate (8G21-01) or 5 plates (8G21-02) of 96 wells coated with recombinant HBcAg.

Allow the wells to reach 18 to 30°C before removing from the bag. place any unused wells in the sealable storage bag provided and return to 2 to 8°C.

SAMPLE DIL 2. Sample Diluent

Five bottles (7 mL per bottle) containing a green/yellow buffered solution.

The Sample Diluent is susceptible to oxidation so the bottle must be kept closed with a bung and a cap whenever possible.

After first opening, the Sample Diluent is stable at 2 to 8°C for up to one week. The bottle must not be opened for use on more than three occasions.

CONJUGATE 3. Conjugate

One bottle (8G21-01) or five bottles (8G21-02) (7 mL) containing monoclonal anti-HBc conjugated to horseradish peroxidase in a red buffered solution. Contains 0.05% ProClin[®] 300 preservative.

CONTROL + ⚠ 4. Positive Control

One bottle containing 2 mL of anti-HBc diluted in a buffered diluent containing a blue dye. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.

CONTROL - ⚠ 5. Negative Control

One bottle (2 mL) of human serum containing a green dye. Contains 0.05% Bronidox[®] preservative.

SUBSTRATE DIL 6. Substrate Diluent

One bottle containing 35 mL of a colourless solution of tri-sodium citrate and hydrogen peroxide.

SUBSTRATE CONC 7. Substrate Concentrate

One bottle containing 35 mL of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) and stabilisers in an orange solution.

Substrate Solution

To prepare the Substrate Solution add a volume of colourless Substrate Diluent to an equal volume of orange Substrate Concentrate in either a clean glass or plastic vessel. **It is important that this order of addition is followed and that any pipettes and glassware used to prepare Substrate Solution are clean.** Alternatively, the Substrate Solution may be made by pouring the entire contents of the bottle of Substrate Diluent into the bottle of Substrate Concentrate. On addition of the Diluent, the Concentrate will change colour from orange to yellow. One bottle of Substrate Solution provides sufficient reagent for at least five plates - see **Table 1**.

Tabela 1
Volume of Substrate Concentrate and Substrate Diluent Required

Number of Wells	Number of Plates
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88	1 2 3 4
Substrate Concentrate (mL)	
1.0 1.5 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 5.0	6 12 18 22
Substrate Diluent (mL)	
1.0 1.5 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 5.0	6 12 18 22

Additional reagent may be required for use with automated systems. Keep away from all natural and artificial light. The Substrate Solution should be yellow; if it is green before being used, it should be discarded and fresh Substrate Solution prepared.

The prepared Substrate Solution from this kit may be used interchangeably with that from all other Murex kits which use orange coloured Substrate Concentrate. Ensure that the Substrate Solution is prepared from Substrate Diluent and Substrate Concentrate provided together.

The prepared Substrate Solution is stable refrigerated (2 to 8°C) or at 15 to 25°C for up to two days but must be discarded if crystals have formed.

WASH	FLUID
------	-------

8. Wash Fluid

One bottle (8G21-01) or two bottles (8G21-02) containing 125 mL of 20 times working strength Glycine/Borate Wash fluid. Contains 0.2% Bronidox® preservative.

Add one volume of Wash fluid concentrate to 19 volumes of distilled or deionized water to give the required volume or dilute the entire contents of one bottle of Wash fluid to a final volume of 2500 mL. Crystals may be observed in the Wash fluid concentrate but these crystals will dissolve when the Wash fluid is diluted to working strength. When diluted, the Wash fluid contains 0.01% Bronidox® preservative.

The Wash fluid from this kit may be used interchangeably with the Glycine/Borate Wash fluid from any other Murex kit.

Store the working strength Wash fluid at 18 to 30°C in a closed vessel under which conditions it will retain activity for one month.

NOTE: The Wash fluid may develop a yellow colour on storage. This will have no effect on the performance of the assay providing the Wash fluid is fully aspirated from the wells.

NOTE: Although the Substrate Solution and Wash fluid are interchangeable, they must not be used beyond the expiry date printed on the component labels.

WARNINGS AND PRECAUTIONS



The reagents are for *in vitro* diagnostic use only.

For professional use only.

Please refer to the manufacturer's safety data sheet and the product labelling for information on potentially hazardous components.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION



CAUTION: This kit contains components of human origin. The human sera used for manufacture have been screened and found reactive or non-reactive for analytes as shown in **Table 2** below.

Table 2

Component	Reactive for	Non-reactive for
Negative Control	N/A	HBsAg, and antibodies to HIV (types 1 and 2), and HCV
Positive Control	HBsAg	Antibodies to HIV (types 1 and 2), and HCV

All reactive serum used has been inactivated prior to use in reagent preparation. However, all material of human origin should be considered as potentially infectious and it is recommended that this kit and test specimens be handled using established good laboratory practice.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP) hazardous reagents are classified and labeled as follows:

Reagents:	CONJUGATE
Classification:	Skin sens. 1 H317
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.
Precautionary Statements:	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P363 Wash contaminated clothing before reuse. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
Contains:	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).
Reagents:	SAMPLE DIL
Classification:	Eye Irrit. 2 H319
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H319 Causes serious eye irritation; EUH031 Contact with acids liberates toxic gas.
Precautionary Statements:	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P337+P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
Reagents:	SUBSTRATE CONC
Classification:	Eye Irrit. 2 H319
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H319 Causes serious eye irritation
Precautionary Statements:	P264 Wash hands thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP), WASH FLUID is labeled as EUH210, safety data sheets available on request.

For additional information see Safety Data Sheets available on www.diasorin.com

1. Potentially contaminated materials should be disposed of safely according to local requirement.
2. Spillage of potentially infectious materials should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued. Sodium hypochlorite should not be used on acid containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.

3. Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
4. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
5. The following reagent contains low concentrations of harmful or irritant substances.
 - a) The Sample Diluent contains Saponin.
6. Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If either come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
7. If any of the reagents come into contact with the skin or eyes, wash the area extensively with water.

ANALYTICAL PRECAUTIONS

1. Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
2. Do not modify the **Test procedure** or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
3. Allow all reagents and samples to come to 18 to 30°C before use. Immediately after use return all reagents to the recommended storage temperature.
4. Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionised water.
5. Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of reagents and samples.
6. Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
7. Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
8. Do not cross-contaminate reagents. Dedicate a pipette for use with the Substrate Solution of Murex assays. A pipette should also be dedicated for use with the Conjugate.
9. Do not touch or splash the rim of the well with Conjugate. Do not blow out from micropipettes; reverse pipetting is recommended wherever possible.
10. Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
11. Do not contaminate microwells with dust from disposable gloves.
12. When using fully automated microplate processors
 - i) It is not necessary to use plate lids and to tap dry the wells.
 - ii) Do not allow system fluids from fully automated microplate processors to contaminate the samples or reagents.
 - iii) The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assays on fully automated processors.
13. Ensure the assay is run within the temperature limits defined in the assay protocol.
14. Do not use CO₂ incubators.
15. Do not store the Stop Solution in a shallow dish or return it to a stock bottle after use.
16. The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assay protocols on instrumentation.

SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

SPECIMEN COLLECTION

Serum, EDTA plasma or citrate plasma samples may be used. Ensure that the serum samples are fully clotted. Remove any visible particulate matter from the sample by centrifugation. If samples are prepared using liquid anti-coagulants e.g. citrate plasma, the dilution effect should be considered.

SPECIMEN TRANSPORT AND STORAGE

Store samples at 2 to 8°C. Samples not required for assay within 7 days should be removed from the clot or cell pellet and stored frozen (-15°C or colder). Avoid multiple freeze-thaw cycles. After thawing, ensure samples are thoroughly mixed before testing.

PROCEDURE

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. **Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid)**. Add 3 to 11 mL of analytical grade concentrated sulphuric acid (18.0M) to about 80 mL of distilled or deionized water and then make up to 100 mL with more water. Alternatively, the following reagent can be used: 1N Sulphuric Acid (Code N0164 - 15 vial pack and N0165 - 1 vial pac).
2. **Freshly distilled or high quality deionised water** is required for dilution of Wash fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
3. **Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
4. **Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
5. **Moulded Heating Block** (Code 5f09-02) for use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
6. **Instrumentation**
 - a) Automated microplate stripwasher,
 - b) Microplate reader, or
 - c) Fully automated microplate processor.
 All instruments must be validated before use. Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
7. **Disposable Reagent Troughs**. (Code 5F24-01).
8. **Sodium hypochlorite** for decontamination. (Refer to **Health and Safety Information**).
9. **Sodium hydroxide solution** (0.1M). (For instrument decontamination).

TEST PROCEDURE

Please read **Analytical Precautions** carefully before performing the test.

Addition of the various components of the assay to the wells may be confirmed visually by examining the plate for the following colours:

Sample diluent is green/yellow in colour. On addition of Sample or Control the colour will change to blue/green. The colour change will vary from sample to sample but some change should always be visible.

Conjugate is red in colour.

Substrate Solution is initially pale yellow with any non-reactive wells becoming blue/green. On addition of Stop Solution the blue/green colour of the non-reactives will change to orange/yellow, whilst the reactives will change to a pink colour.

The addition of sample or reagent can be confirmed using a microplate reader as follows.

2.4. a-HBc antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 96 testų. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 4 šulinėliai.

Sample Diluent plus Sample read at 570 or 620 nm with a reference at 690 nm.
 Conjugate at 490 nm with a reference at 690 nm.
 Substrate Solution at 450 nm (no reference).

SEMI AUTOMATED PROCESSING

Step 1	Use only the number of Wells required for the test.	
Step 2	Prepare the Wash Fluid .	
Step 3	Add 50 µL of Sample Diluent to each well.	50 µL
Step 4	Add 50 µL of Sample or Control to the wells. For each run add Negative Control to Wells A1 and B1 and the Positive Control to Wells C1 and D1.	50 µL
Step 5	Add the Controls to the designated Wells after dispensing the samples. Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 mins
Step 6	At the end of the incubation period wash the plate as described under Wash Procedures . After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbant paper.	
Step 7	Add 50 µL of Conjugate to each Well.	50 µL
Step 8	Cover the wells with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 mins
Step 9	Prepare the Substrate Solution .	
Step 10	At the end of the incubation period wash the plate as described under Wash Procedures . After washing is completed invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbent paper.	
Step 11	Immediately after washing the plate, add 100 µL of Substrate Solution to each well.	100 µL
Step 12	Cover the wells with a lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C. Keep away from direct sunlight.	30 mins
Step 13	Add 50 µL of Stop Solution .	50 µL
Step 14	Within 15 minutes read the absorbance at 450 nm using 620 nm to 690 nm as the reference wavelength if available. Blank the instrument on air (no plate in the carriage).	450 mm

WASH PROCEDURES

Protocols for recommended washers and procedures for verifying washers and analysers can be obtained from your representative. The following protocol is recommended:

a) **Protocol for automated microplate stripwasher**

Perform 5 wash cycles using working strength Wash Fluid. Ensure, where possible, that:

- i) Flow-through washing with a fill volume of 500 µL/well is used with instrumentation supplied by DiaSorin. When using other instrumentation for which this is not possible, ensure that the well is completely filled.
- ii) The dispense height is set to completely fill the well with a slight positive meniscus, without causing an overflow.
- iii) The time taken to complete one aspirate/wash/soak cycle is approximately 30 seconds.
- iv) Ensure that no liquid is left in the well (by use of a double aspirate step in the final cycle where possible).

- v) After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash fluid onto absorbent paper.
- b) Protocol for manual washer
 - i) Aspirate the first row of wells.
 - ii) Completely fill this row with working strength Wash fluid.
 - iii) Repeat this procedure for each row of wells in turn.
 - iv) Ensure that each row of wells is left to soak for 30 seconds.
 - v) Repeat (i) to (iv) a further 4 times.
 - vi) Aspirate the contents of the wells. It is recommended that the wells are inverted and tapped dry on paper towel or tissue after the last wash.

NOTE: Do not allow the wells to become dry during the assay procedure.

Washers must be rinsed with distilled water at the end of the test to avoid blockage and corrosion.

FULLY AUTOMATED MICROPLATE PROCESSORS

Contact your representative for details of currently available validated protocols. For instrumentation without established validated protocols, the following guidelines are recommended.

1. Do not programme times shorter than specified in the procedure.
2. For each incubation at 37°C, programmed times may be increased by up to 5 minutes.
3. Wells containing either Sample Diluent or Sample Diluent and sample/ control may be left at 18 to 30°C (room temperature) for up to 2 hours before starting **Step 4 and 5 respectively**.
4. Ensure all "**Analytical precautions**" are followed. Protocols written following these guidelines must be fully validated prior to use according to local procedures.

RESULTS

CALCULATION OF RESULTS

Each plate must be considered separately when calculating and interpreting results of the assay.

Approved software may be used for calculation and interpretation of results.

Negative Control

Calculate the mean absorbance of the Negative Controls.

Positive Control

Calculate the mean absorbance of the Positive Controls.

Cut-off value

Calculate the Cut-off value by adding the mean absorbance of the positive Control to the mean absorbance of the Negative Control and divide this value by two.

Example:

Negative Control Absorbance	
Well 1	= 1.652
Well 2	= 1.586
Mean Negative Control	= (1.652 + 1.586)/2 = 1.619
Positive Control absorbance	
Well 3	= 0.040
Well 4	= 0.042
Mean Positive Control	= (0.040 + 0.042)/2 = 0.041
Cut-Off value	= (1.619 + 0.041)/2 = 0.830

QUALITY CONTROL

Results of an assay are valid if the following criteria for the Controls are met:

Negative Control minus Positive Control

The mean absorbance is between 0.5 and 2.2.

Positive Controls

The mean absorbance is less than 0.24.

Assays which do not meet these criteria should be repeated.

In the unlikely event of the results repeatedly failing to meet either the Quality Control criteria or the expected performance of the test, please contact your representative.

INTERPRETATION OF RESULTS

Non-reactive Results

Samples giving an absorbance greater than the Cut-off value are considered non-reactive in the assay.

Reactive Results

Samples giving an absorbance equal to or less than the Cut-off value are considered reactive in Murex anti-HBc (total). Unless local procedures state otherwise, such samples must be retested in duplicate using the original source. Samples that are reactive in at least one of the duplicate retests are considered repeatedly reactive in Murex anti-HBc (total) and are presumed to contain antibodies to HBc. Such samples must be further investigated and the results from this assay considered with any other clinical and/or assay information. Samples which are non-reactive in both wells on retest must be considered non-reactive in this assay.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Murex anti-HBc (total) has been determined by testing samples from random blood donors, patients with known antibody to hepatitis B core antigen and patients in other clinical categories.

Diagnostic Sensitivity

A total of 447 specimens from patients known to contain antibody to hepatitis B core antigen were tested and found to be reactive with Murex anti-HBc (total). The specimens were taken from patients at various stages of HBV infection and included 139 specimens with IgM antibody to hepatitis B core antigen.

The diagnostic sensitivity of Murex anti-HBc (total) on this population of specimens is therefore estimated to be 100% (447/447) with a lower 95% confidence limit of 99.18% by the binomial distribution.

Diagnostic Specificity

A total of 360 specimens from patients with conditions unrelated to HBV infection and confirmed as negative for antibody to hepatitis B core antigen were also tested with Murex anti-HBc (total). These included haemolysed specimens, specimens from pregnant women, patients suffering with autoimmune disease and patients with other acute viral infections.

In addition, a panel of lipaemic and icteric specimens were tested and found to be non-reactive.

The diagnostic specificity of Murex anti-HBc (total) on this population of clinical specimens is estimated to be 100% (360/360) with a lower 95% confidence limit of 98.98%.

Screening Specificity

A total of 5344 routine donor specimens from two European and two South American blood transfusion centres were screened with Murex anti-HBc (total). The results are summarised in Table 3. In the study, 99.14% (5298/5344) of specimens were non-reactive and 0.86%

(46/5344) were repeatedly reactive. Thirty two of the repeatedly reactive specimens were confirmed positive by testing with at least two other commercial assays for the detection of antibody to hepatitis B core antigen. None of the remaining fourteen specimens were confirmed as positive for the presence of antibody to hepatitis B core antigen.

The screening specificity of Murex anti-HBc (total) on this population of negative routine donor specimens is estimated to be 99.74% (5298/5312) with 95% confidence limits of 99.86% to 99.56% by the binomial distribution.

Tabela 3
Reactivity of Murex anti-HBc (total) with presumed negative specimens from routine blood donors

Centre	Number of routine donor specimens tested	Number of repeatedly reactive specimens	Number of confirmed positive specimens	Number of false reactive specimens
A	1975	9	2	7 (0.35%)
B	2081	10	7	1 (0.05%)
C	608	18	16	2 (0.33%)
D	680	11	7	4 (0.59%)
TOTAL	5344	46	32	14 (0.26%)

Assay Reproducibility

Five quality assurance panel members were tested as ten replicates on four separate occasions to assess the reproducibility of Murex anti-HBc (total). The results from the testing are summarised in Table 4.

Tabela 4
Murex anti-HBc (total) - Assay Reproducibility

Specimen	Number of assays	Number of replicates	Cut-off value/ Mean Absorbance	Intra-assay %CV	Inter-assay %CV
QA01	4	10	0.782	6.1	6.7
QA02	4	10	1.263	6.7	8.9
QA03	4	10	2.672	7.4	8.4
QA04	4	10	2.380	7.3	8.7
QA05	4	10	0.982	5.4	6.3

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The **Test Procedure** and **Interpretation of Results** must be followed.
2. This test has only been evaluated for use with individual (unpooled) serum, EDTA plasma or citrate plasma samples.
3. A negative result with an antibody detection test does not preclude the possibility of infection.
4. Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.
5. The most common sources of error are:
 - a) Imprecise delivery of Sample, Conjugate or Substrate into the wells.
 - b) Contamination of Substrate with Conjugate.
 - c) Contamination with conjugates from other assays.
 - d) Blocked or partially blocked washer probes.
 - e) Insufficient aspiration leaving a small volume of Wash fluid in the wells.
 - f) Failure to ensure that the bottom surface of the wells is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before a plate is read.
 - g) Failure to read at the correct wavelength or use of an incorrect reference wavelength.

6. The use of highly haemolysed samples, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
7. This test has not been evaluated for use with samples from cadavers.

BIBLIOGRAPHY

1. **Hoofnagle, J.H.** et al. (1973).
Antibody to hepatitis-B-core in man. *Lancet*, **II**, 869.
2. **Hansson, B.G.** (1977).
Persistence of serum antibody to hepatitis B core antigen. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 209.
3. **Lemon, S.M.** et al. (1981).
IgM antibody to hepatitis B core antigen as a diagnostic parameter of acute infection with hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.*, **143**, 803.
4. **Centres for Disease Control** (1985).
Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox[®] and ProClin[®] are not trade marks of DiaSorin.

 DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

 DiaSorin Italia S.p.A.
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

C11DS65GB
July, 2022

Peržiūrėta 2022 m.
liepos mėn.

Murex anti-HBc (total)

Imunofermentinis tyrimas, skirtas nustatyti antikūnus prieš hepatito B šerdies antigeną (angl. anti-HBc) žmogaus serume arba plazmoje.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į anti-HBc buvimą arba kaip HBV infekcijos diagnostikos priemonė.

Klientų aptarnavimas

Dėl papildomos informacijos apie produktą susisiekite su vietos klientų aptarnavimo organizacija.

Prieš naudojimą reikia atidžiai perskaityti šias naudojimo instrukcijas. Būtina rūpestingai laikytis naudojimo instrukcijų. Esant nukrypimui nuo naudojimo instrukcijų, tyrimo rezultatų patikimumo garantuoti negalima.

IVD

Pagrindiniai naudojami simboliai			
	Sąrašo numeris		<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisas
	Serijos numeris		Laikyti 2-8°C temperatūroje
	Galiojimo terminas		ATSARGIAI. Žr. pridėtus dokumentus
	Gamintojas		Žr. naudojimo instrukcijas
			Saugoti nuo saulės šviesos

Reagento komponentų pavadinimuose naudojamų simbolių išsamų paaiškinimą galite rasti skyriuje **REAGENTAI**.

PASKIRTIS

„Murex anti-HCc (total)“ skirtas nustatyti antikūnus prieš hepatito B šerdies antigeną (angl. anti-HBc) žmogaus serume arba plazmoje.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į anti-HBc buvimą arba kaip HBV infekcijos diagnostikos priemonę.

SANTRAUKA IR TYRIMO PAAIŠKINIMAS

„Murex anti-HBc (total)“ yra konkurencinis imunofermeninis tyrimas, skirtas nustatyti antikūnus prieš hepatito B šerdies antigeną (anti-HBc). Anti-HBc titrai po užsikrėtimo HBV¹ staigiai didėja. Sumažėję titrai po hepatito B paviršiaus antigeno (angl. HBsAg) klirenso ir infekcijos reiškinį pasibaigimo². Todėl anti-HBc buvimas rodo ir buvusį užsikrėtimą HBV, ir infekcijos ūminę arba lėtinę stadiją.

Aktyvios infekcijos fazėje paprastai randami abu anti-HBc imunoglobulinai: M (IgM) ir G (IgG), todėl jie gali būti tik serologiniai HBV infekcijos žymenys inkubaciniu laikotarpiu, kai HBsAg jau pašalinamas, tačiau antikūnų prieš HBsAg dar neaptinkama³. „Murex anti-HBc (total)“ aptinka IgG ir IgM antikūnus prieš hepatito B šerdies antigeną.

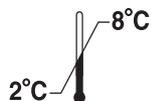
PROCEDŪROS PRINCIPAS

„Murex anti-HBc (total)“ pagrindas yra mikrošulinėliai, padengti rekombinaciniu hepatito B šerdies antigenu (HBcAg). Mėginiai ir kontrolės medžiagos inkubuojami šulinėliuose ir anti-HBc (jeigu jo yra mėginyje arba kontrolės medžiagoje) susijungia su HBcAg. Po to antikūno perteklius (jeigu yra) pašalinamas plovimo metu. Tada į šulinėlius pridedama konjugato (monokloninio anti-HBc, konjuguoto su krienų peroksidaze). Atliekama antra inkubacija, kurios metu konjugatas jungiasi su šulinėlio paviršiuje esančiu HBcAg (jeigu jo yra), kurio neblokavo tiriamojo mėginio anti-HBc. Po plovimo pašalinus nesusijungusio konjugato likučius, į šulinėlius įpilama tirpalo su 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidinu (TMB) ir vandenilio peroksidu. Šulinėliai, kuriuose nėra anti-HBc (ir todėl nėra susijungusio konjugato), nusidažo mėlynai žalia spalva, o sustabdžius fermentavimo reakciją sieros rūgštimi - oranžine spalva. Spalvos intensyvumą galima nustatyti spektrofotometru. Jeigu anti-HBc nėra, spalvos intensyvumas būna didžiausias. Kuo didesnė anti-HBc koncentracija mėginyje, tuo blankesnė spalva.

REAGENTAI

APRAŠYMAS, PARUOŠIMAS NAUDOTI IR REKOMENDUOJAMOS LAIKYMO SĄLYGOS

Taip pat žr. **Įspėjimai ir atsargumo priemonės**.



Visus komponentus reikia laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje, jei nenurodyta kitaip; tokiomis sąlygomis jie išlieka aktyvūs iki rinkinio tinkamumo naudoti datos.

COATED WELLS 1. Dengti šulinėliai

Viena plokštelė (8G21-01) arba 5 plokštelės (8G21-02), kuriose yra po 96 šulinėlius, dengtus rekombinaciniu HBcAg.

Prieš išimdami iš maišelio palaukite, kol šulinėliai sušils iki temperatūros nuo 18 iki 30°C. Nenaudojamus šulinėlius sudėkite į kartu tiekiamą uždaramą maišelį ir laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje.

SAMPLE	DIL
--------	-----

2. Mėginių skiediklis

Penki buteliai (po 7 mL viename butelyje), kuriuose yra žaliai geltono buferinto tirpalo.

Mėginių skiediklis neatsparus oksidavimui, todėl, kai įmanoma, butelį reikia laikyti uždarytą kamščiu ir dangteliu. Po pirmojo atidarymo mėginių skiediklis, laikomas nuo 2 iki 8°C temperatūroje, išlieka stabilus vieną savaitę. Butelio naudojimui negalima atidaryti daugiau nei tris kartus.

CONJUGATE

3. Konjugatas

Vienas butelis (8G21-01) arba penki buteliai (8G21-02) (po 7 mL), kuriuose yra monokloninio anti-HBc, konjuguoto su krienų peroksidaze ir pateikiamo raudoname buferintame tirpale. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „ProClin® 300“.

CONTROL	+	⚠
---------	---	---

4. Teigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 2 mL anti-HBc, atskiesto buferintu skiedikliu su mėlynu dažikliu. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL	-	⚠
---------	---	---

5. Neigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis (2 mL), kuriame yra žmogaus serumo su žaliu dažikliu. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

SUBSTRATE	DIL
-----------	-----

6. Substrato skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 35 mL bespalvio trinitrato ir vandenilio peroksido tirpalo.

SUBSTRATE	CONC
-----------	------

7. Substrato koncentratas



Vienas butelis, kuriame yra 35 mL 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) ir stabilizatorių oranžiniame tirpale.

Substrato tirpalas

Norėdami paruošti substrato tirpalą, į švarų stiklinį arba plastikinį indą įpilkite oranžinio substrato koncentrato ir į jį toki pat kiekį bespalvio substrato skiediklio. **Svarbu laikytis šios įpylimo eilės tvarkos, o visos pipetės ir stikliniai indai, naudojami ruošti substrato tirpalą, turi būti švarūs.** Alternatyviai substrato tirpalą galima pagaminti supilant visą substrato skiediklio butelio turinį į substrato koncentrato butelį. Įpylus skiediklio, oranžinis koncentratas nusidažo geltonai. Viename substrato tirpalo butelyje esančio reagento pakanka ne mažiau nei penkioms plokštelėms - žr. 1 lentelę.

1 lentelė
Reikiamas substrato koncentrato ir substrato skiediklio kiekis

Šulinėlių skaičius	Plokštelių skaičius
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88	1 2 3 4
Substrato koncentratas (mL)	
1,0 1,5 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 5,0	6 12 18 22
Substrato skiediklis (mL)	
1,0 1,5 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 5,0	6 12 18 22

Naudojant su automatinėmis sistemomis gali reikėti papildomo reagento. Saugoti nuo visų natūralios ir dirbtinės šviesos šaltinių. Substrato tirpalas turi būti geltonas; jeigu prieš naudojimą jis yra žalias, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą.

Vietoj paruošto šio rinkinio substrato tirpalo galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio, kuriam naudojamas oranžinis substrato koncentratas, tirpalą. Užtikrinkite, kad substrato tirpalas būtų ruošiamas iš viename rinkinyje esančių substrato skiediklio ir substrato koncentrato.

Paruoštas substrato tirpalas, laikomas šaldytuve (nuo 2 iki 8°C temperatūroje) arba nuo 15 iki 25°C temperatūroje, išlieka stabilus ne daugiau nei dvi dienas, tačiau jį reikia išmesti, jeigu susidaro kristalų.

WASH	FLUID	8. Plovimo skystis
------	-------	---------------------------

Vienas butelis (8G21-01) arba du buteliai (8G21-02), kuriuose yra po 125 mL 20 kartų koncentruoto glicino/borato plovimo skysčio. Sudėtyje yra 0,2% konservanto Bronidox®.

Vieną dalį koncentruoto plovimo skysčio įpilkite į 19 dalių distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad gautumėte reikiamą tūrį, arba praskieskite visą vieno plovimo skysčio butelio turinį, kad gautumėte 2500 mL galutinio tirpalo. Plovimo skysčio koncentrate gali būti kristalų, tačiau šie kristalai ištirps, kai plovimo skystis bus praskiestas iki darbinio stiprumo. Praskiestame plovimo skystyje yra 0,01% konservanto Bronidox®.

Vietoj šio rinkinio plovimo skysčio galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio glicino/borato plovimo skystį.

Darbinio stiprumo plovimo skystį laikykite nuo 18 iki 30°C temperatūroje uždareme inde. Tokiomis sąlygomis jis išliks aktyvus vieną mėnesį.

PASTABA. Laikymo metu plovimo skystis gali pagelsti. Tai neturės įtakos tyrimo atlikimui, jeigu visas plovimo skystis bus išsiurbiamas iš šulinėlių.

PASTABA. Nors galima naudoti kitų rinkinių substrato tirpalą ir plovimo skystį, jų negalima naudoti pasibaigus tinkamumo datai, atspausdintai ant komponentų etiketės.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS



Reagentai skirti tik *in vitro* diagnostikai.

Tik profesionaliam naudojimui.

Informaciją apie potencialiai pavojingus komponentus galite rasti gamintojo saugos duomenų lape ir gaminio žymėjime.

SVEIKATOS IR SAUGOS INFORMACIJA



ATSARGIAI. Šiame rinkinyje yra žmogaus kilmės komponentų.

Gamybai naudojamas žmogaus serumas buvo patikrintas ir nustatytas jo reagavimas arba nereagavimas su analitėmis, kaip nurodyta 2 lentelėje toliau.

2 lentelėje

Komponentas	Reagavo su	Nereagavo su
Neigiama kontrolės medžiaga	Netaikytina	HBsAg ir antikūnais prieš ŽIV (1 ir 2 tipo) bei HCV
Teigiama kontrolės medžiaga	HBsAg	Antikūnais prieš ŽIV (1 ir 2 tipo) ir HCV

Prieš naudojimą reagento ruošimui, visi naudojami reagavę serumo mėginiai buvo išaktyvinti. Nepaisant to, visas žmogaus kilmės medžiagas reikia laikyti potencialiai infekcinėmis ir su šiuo rinkiniu bei tiriamaisiais bandiniais reikia dirbti laikantis nustatytos geros laboratorinės praktikos.

Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) pavojingi reagentai klasifikuojami ir pažymėti taip:

Reagentai:	CONJUGATE
Klasifikacija:	Skin Sens. 1H317
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojingumo frazės:	H317 gali sukelti alerginę odos reakciją.
Atsargumo frazės:	P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P363 užterštus drabužius išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. P333+P313 jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją.
Sudėtis:	Reakcijos masė: 5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (EB Nr. 247-500-7) ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas (EB Nr. 220-239-6) (3:1).
Reagentai:	SAMPLE DIL
Klasifikacija:	Eye Irrit. 2 H319
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojingumo frazės:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą; EUH031 kontaktuodama su rūgštimis išskiria toksiškas dujas.
Atsargumo frazės:	P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. P337+P313 jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją.
Reagentai:	SUBSTRATE CONC
Klasifikacija:	Eye Irrit. 2 H319
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojingumo frazės:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą
Atsargumo frazės:	P264 po naudojimo kruopščiai nusiplauti rankas. P280 mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

Remiantis Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) WASH FLUID pažymėtas fraze EUH210 (saugos duomenų lapus galima gauti paprašius).

Papildomos informacijos ieškote saugos duomenų lapuose, esančiuose interneto svetainėje www.diasorin.com

1. Potencialiai kontaminuotas medžiagas reikia šalinti saugiai pagal vietos reikalavimus.
2. Išsiliejusias potencialiai infekcines medžiagas reikia nedelsiant surinkti sugeriančiu popieriniu rankšluosčiu, o prieš tęsiant darbą, užterštą vietą reikia nuvalyti, pavyzdžiui, 1,0% natrio hipochloritu⁴. Natrio hipochlorito negalima naudoti išsiliejus medžiagoms, kurių sudėtyje yra rūgšties, išsiliejimo vietos prieš tai sausai nenušluosčius. Išsiliejusioms medžiagos valyti naudojamos priemonės, įskaitant pirštines, turi būti utilizuojamos kaip potencialiai biologiškai pavojingos atliekos. Neautoklavuokite medžiagų, kurių sudėtyje yra natrio hipochlorito.
3. Neutralizuotas rūgštis ir kitas skystas atliekas reikia nukenkinti pridėdamas pakankamą kiekį natrio hipochlorito, kad galutinį koncentracija būtų mažiausiai 1,0%. Kad nukenkaminimas būtų veiksmingas, gali prireikti palikti 1,0% natrio hipochlorito tirpalą 30 minučių.
4. Nepipetuokite burna. Naudodami mėginius ir atlikdami tyrimą dėvėkite vienkartinės pirštines ir akių apsaugą. Pabaigę, kruopščiai nusiplaukite rankas.
5. Šių reagentų sudėtyje yra nedidelės koncentracijos dirginančių medžiagų.
 - a) Mėginių skiediklyje yra saponino.
6. Stabdymo tirpalui reikalinga sieros rūgštis ir stiklinėms priemonėms plauti naudojama druskos rūgštis yra korozinės ir jas reikia naudoti atitinkamai atsargiai. Jeigu kuri nors iš jų pateko ant odos arba į akis, kruopščiai nuplaukite vandeniu.
7. Jeigu kuris nors reagentas pateko ant odos arba į akis, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.

ANALIZĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Pasibaigus nurodytam galiojimo terminui, reagentų nenaudokite. Reikia vengti mikrobiologinio reagentų užteršimo, nes tai gali sumažinti produkto tarnavimo laiką ir dėl to gauti rezultatai gali būti klaidingi.
2. Nekeiskite **Tyrimo procedūros** ir nepakeiskite reagentų kitų gamintojų ar kitos partijos reagentais, nebent nurodyta, kad reagentas keičiamas. Netrumpinkite nurodytos inkubacijos trukmės.
3. Prieš naudojimą visus reagentus ir mėginius palaikykite 18-30°C temperatūroje. Iškart po naudojimo, visus reagentus grąžinkite į rekomenduojamą laikymo temperatūrą.
4. Su reagentais naudojamas stiklines priemonės reikia kruopščiai išplauti 2M druskos rūgštimi ir po to išskalauti distiliuotu arba labai kokybišku dejonizuotu vandeniu.
5. Nelaikykite reagentų ir mėginių savaime šaldikliuose su automatinio atitirpymo funkcija.
6. Laikymo metu ar inkubacijos etape reagentų neveikite ryškia šviesa ar hipochlorito garais.
7. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.
8. Neužterškite venų reagentų kitais. Naudoti su „Murex“ analizės substrato tirpalu paskirkite atskirą pipetę. Reikia skirti vieną pipetę naudoti su konjugatu.
9. Nepalieskite ir neaptašykite šulinėlio krašto konjugatu. Nepūskite skysčių iš mikropipetės; jeigu įmanoma, rekomenduojama naudoti reversinį pipetavimą.
10. Prieš nuskaitydami plokštelę patikrinkite, ar plokštelės dugnas yra švarus ir sausas, ir ar skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
11. Neužterškite mikrošulinėlių dulkėmis nuo vienkartinį pirštinių.

12. Visiškai automatinų mikroplokštelių procesorių naudojimas
 - i) Nebūtina naudoti plokštelių dangtelių ir sausai iššluostyti šulinėlių.
 - ii) Neleiskite sistemos skysčiams iš visiškai automatizuotų mikroplokštelių procesorių užteršti mėginių ar reagentų.
 - iii) Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimai visiškai automatizuotuose procesoriuose.
13. Užtikrinkite, kad tyrimas būtų atliekamas temperatūros ribose, nurodytose tyrimo protokole.
14. Nenaudokite CO₂ inkubatorių.
15. Nelaikykite stabdymo tirpalo sekliame inde ir po naudojimo nesupilkite jo atgal į atsargų butelį.
16. Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimai su instrumentais protokolais.

BANDINIŲ ĖMIMAS, TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

BANDINIŲ ĖMIMAS

Galima naudoti serumo, plazmos su EDTA arba plazmos citratu mėginius. Užtikrinkite, kad serumo mėginiai būtų visiškai sukrešę. Pašalinkite iš mėginio visas matomas daleles centrifuguodami. Jeigu mėginiai paruošti naudojant skystus antikoagulantus (pvz., plazma su citratu), reikia apsvarstyti skiedimo poveikį.

BANDINIŲ TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

Mėginius laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje. Jeigu mėginių nereikia tirti per 7 dienas, juos reikia atskirti nuo krešulio arba ląstelių agregatų ir laikyti užšaldytą (-15°C arba žemesnėje temperatūroje). Venkite daugkartinių užšaldymo-atšildymo ciklų. Atšildę užtikrinkite, kad mėginiai prieš tyrimą būtų kruopščiai išmaišyti.

PROCEDŪRA

NEPATEIKTOS, TAČIAU REIKALINGOS MEDŽIAGOS

1. **Stabdymo tirpalas (nuo 0,5M iki 2M sieros rūgštis).** Nuo 3 iki 11 mL laboratorinės paskirties koncentruotos sieros rūgštis (18,0M) įpilkite į maždaug 80 mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens, po to papildykite vandens iki 100 mL tūrio. Alternatyviai galima naudoti šį reagentą: 1N sieros rūgštis (kodas N0164, 15 flakonų pakuotė, ir N0165, 1 flakono pakuotė).
2. Plovimo skysčiui praskiesti, stabdymo tirpalui paruošti ir naudoti kartu su automatinėmis plovyklėmis reikia **šviežio distiliuoto arba aukštos kokybės dejonizuoto vandens.**
3. Atitinkamo tūrio **mikropipetės ir daugiakanalės mikropipetės.**
4. **Inkubatorius**, galintis palaikyti tyrimo protokole nurodyto diapazono temperatūrą.
5. **Forminis šildymo blokas** (kodas 5F09-02), skirtas laboratoriniams inkubatoriams. Geriausia forminį šildymo bloką laikyti naudojamame inkubatoriuje. Jeigu tai neįmanoma, jį reikia įdėti į inkubatorių ne mažiau nei keturias valandas iki tyrimo pradžios.
6. **Instrumentai**
 - a) Automatinė mikroplokštelių juostų plovyklė,
 - b) Mikroplokštelių skaitytuvas, arba
 - c) Visiškai automatinis mikroplokštelių procesorius.Prieš naudojimą reikia patikrinti visų instrumentų tinkamumą naudoti.
Išsamios informacijos apie rekomenduojamas instrumentų ir tinkamumo įvertinimo procedūrų sistemas ir programinės įrangos protokolus kreipkitės į vietos atstovybę.
7. **Vienkartiniai reagentų loveliai.** (Kodas 5F24-01).
8. **Natrio hipochloritas** dekontaminacijai. (Žr. skyrių **Sveikatos ir saugos informacija**).
9. **Natrio hidroksido tirpalas** (0,1M). (Instrumentų dekontaminacijai).

TYRIMO PROCEDŪRA

Prieš atlikdami tyrimą atidžiai perskaitykite skyrių **Analizės atsargumo priemonės**.

Įvairių tyrimo komponentų įpylimą į šulinėlius galima patvirtinti plika akimi patikrinant plokštelę, ar spalvos yra kaip nurodyta:

Mėginio skiediklis yra žaliai geltonos spalvos. Pridėjus mėginio arba kontrolės medžiagos, spalva pasikeis į mėlynai žalią. Skirtingų mėginių spalvos kis įvairiai, tačiau visada turi būti matomas pokytis.

Konjugatas yra raudonos spalvos.

Substrato tirpalas iš pradžių yra gelsvas, o nereaguojančiuose šulinėliuose tampa mėlynai žalias. Pridėjus stabdymo tirpalo, mėlynai žalia nereaguojančių šulinėlių spalva pakinta į oranžiniai geltoną, o reaguojančių šulinėlių - į rožinę.

Mėginio arba reagento pridėjimą galima patvirtinti naudojant mikroplokštelių skaitytuvą:

Mėginio skiediklis plius mėginys nuskaitomas 570 arba 620 nm bangose, kai referencija 690 nm bangose.

Konjugatas nuskaitomas 490 nm bangose, kai referencija 690 nm bangose.

Substrato tirpalas nuskaitomas 450 nm bangose (referencijos nėra).

PUSIAUS AUTOMATINIS APDOROJIMAS

1 veiksmas	Naudokite tik tyrimui būtiną šulinėlių kiekį.	
2 veiksmas	Paruoškite plovimo skystį .	
3 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL mėginių skiediklio .	50 µL
4 veiksmas	Į šulinėlius įpilkite 50 µL mėginio arba kontrolės medžiagos . Kiekvienam ciklui į šulinėlius A1 ir B1 įpilkite neigiamos kontrolės medžiagos, o į šulinėlius C1 ir D1 - teigiamos kontrolės medžiagos. Padalinę mėginius, kontrolės medžiagas įpilkite į tam skirtus šulinėlius.	50 µL
5 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje .	30 min
6 veiksmas	Baigus inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite, kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros . Baigę plovimą, apverskite plokštelę ir nuvarvinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.	
7 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL konjugato .	50 µL
8 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje .	30 min
9 veiksmas	Paruoškite substrato tirpalą .	
10 veiksmas	Baigus inkubacijos periodui, plokštelę išplaukite, kaip aprašyta skyriuje Plovimo procedūros . Baigę plovimą, apverskite plokštelę ir nuvarvinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.	
11 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µL substrato tirpalo .	100 µL
12 veiksmas	Šulinėlius uždenkite dangteliu ir inkubuokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje . Saugokite nuo tiesioginės saulės šviesos.	30 min

13 veiksmas	Įpilkite 50 µL stabdymo tirpalo.	50 µL
14 veiksmas	15 minučių laikotarpyje nuskaitykite absorbuojamąją gebą 450 nm bangose; jeigu yra, referencijai naudokite nuo 620 iki 690 nm ilgio bangas. Atlikite tuščiąjį matavimą instrumentu (be plokštelės laikiklyje).	450 mm

PLOVIMO PROCEDŪROS

Vietos atstovybėje galite gauti plovyklių, kurias rekomenduojama naudoti, ir plovyklių bei analizatorių tikrinimo procedūrų protokolus. Rekomenduojama naudoti šį protokolą:

a) Automatinės mikroplokštelių juostų plovyklės protokolas

Atlikite 5 plovimo ciklus, naudodami darbinio stiprumo plovimo skystį. Jeigu įmanoma, užtikrinkite, kad:

- su DiaSorin tiekiamais instrumentais būtų naudojama 500 µL/šulinėliui užpildymo tūrio pratekančioji plovimo srovė. Jeigu naudojami kiti instrumentai, su kuriais tai neįmanoma, užtikrinkite, kad šulinėlis būtų visiškai užpildytas.
- Įpylimo aukštis nustatytas taip, kad užpildytų visą šulinėlį su nedideliu teigiamu paviršiaus išsipūtimu, bet nebūtų perpildos.
- Vienam įsiurbimo/plovimo/mirkymo ciklui atlikti reikia maždaug 30 sekundžių.
- Užtikrinkite, kad šulinėlyje neliktų skysčio (jeigu galima, pabaigos cikle atlikite du įsiurbimo veiksmus).
- Baigę plovimą, apverskite plokštelę ir nuvarvinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.

b) Rankinės plovyklės protokolas

- Įsiurbkite pirmąjį šulinėlių eilę.
- Visiškai užpildykite šią eilę darbinio stiprumo plovimo skysčio.
- Pakartokite šią procedūrą iš eilės su visomis šulinėlių eilėmis.
- Užtikrinkite, kad kiekvienos eilės šulinėliai būtų mirkomi 30 sekundžių.
- Pakartokite veiksmus nuo (i) iki (iv) dar 4 kartus.
- Įsiurbkite šulinėlių turinį. Po paskutinio plovimo rekomenduojama šulinėlius apversti ir sausai nuvarvinti ant popierinio rankšluosčio arba marlės.

PASTABA. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.

Baigus tyrimą, plovyklės reikia išskalauti distiliuotu vandeniu, kad neužsikimštų ir nevyktų korozija.

VISIŠKAI AUTOMATINIS MIKROPLOKŠTELIŲ PROCESORIUS

Išsamios informacijos apie šiuo metu esančius įvertinto tinkamumo protokolus, kreipkitės į vietos atstovybę. Jeigu naudojate instrumentus, neturinčius protokolų, kurių tinkamumas įvertintas, rekomenduojama laikytis šių nurodymų.

- Nesuprogramuokite trukmės mažesnės nei nurodyta procedūroje.
- Kiekvienos inkubacijos 37°C temperatūroje trukmę galima suprogramuoti ne daugiau nei 5 minutes ilgesnę.
- Prieš pradėdant **4 ir 5 veiksmus**, šulinėlius su mėginių skiedikliu arba mėginių skiedikliu ir mėginiu/kontrolės medžiaga galima laikyti nuo 18 iki 30°C (kambario) temperatūroje ne ilgiau nei 2 valandas.
- Užtikrinkite, kad būtų laikomasi visų „**Analizės atsargumo priemonių**“. Prieš naudojimą pagal vietoje nustatytas procedūras reikia išsamiai įvertinti sudarytų protokolų tinkamumą pagal šias gaires.

REZULTATAI

REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS

Skaičiuojant ir interpretuojant tyrimo rezultatus kiekviena plokštelę reikia analizuoti atskirai.

Rezultatus skaičiuoti ir interpretuoti reikia naudojant patvirtintą programinę įrangą.

Neigiama kontrolės medžiaga

Apskaičiuokite vidutinę neigiamų kontrolės medžiagų absorbuojamąją gebą.

Teigiama kontrolės medžiaga

Apskaičiuokite vidutinę teigiamų kontrolės medžiagų absorbuojamąją gebą.

Kirpinio vertė

Kirpinio vertės skaičiavimas: teigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamosios gebos vidurkį sudėkite su neigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamosios gebos vidurkiu ir gautą sumą padalinkite iš dviejų.

Pavyzdys:

Neigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba

1 šulinėlis = 1,652

2 šulinėlis = 1,586

Neigiamos kontrolės

medžiagos vidurkis = $(1,652 + 1,586)/2 = 1,619$

Teigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba

3 šulinėlis = 0,040

4 šulinėlis = 0,042

Teigiamos kontrolės

medžiagos vidurkis = $(0,040 + 0,042)/2 = 0,041$

Kirpinio vertė = $(1,619 + 0,041)/2 = 0,830$

KOKYBĖS KONTROLĖ

Tyrimo rezultatai yra galiojantys, jeigu atitinka šiuos kontrolės kriterijus:

Neigiamos kontrolės medžiagos vertė minus teigiamos kontrolės medžiagos vertė

Vidutinė absorbuojamoji geba yra nuo 0,5 iki 2,2.

Teigiamos kontrolės medžiagos

Vidutinė absorbuojamoji geba yra mažesnė nei 0,24.

Tyrimus, kurie neatitinka šių kriterijų, reikia pakartoti.

Nors tai mažai tikėtina, bet jeigu rezultatai pakartotinai neatitinka kokybės kontrolės kriterijų arba tikėtino tyrimo funkcionalumo, kreipkitės į vietos atstovybę.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Nereaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba, atlikus tyrimą, yra didesnė už kirpinio vertę, laikomi nereaguojančiais.

Reaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba, atlikus „Murex anti-HBc (total)“ tyrimą, yra lygi kirpinio vertei arba didesnė, laikomi reaguojančiais. Tokius mėginius reikia pakartotinai iširti du kartus naudojant originalų šaltinį, jeigu vietos procedūros nenumato kitaip. Mėginiai, kurie reagavo bent viename iš dviejų pakartotinių tyrimų, laikomi kartotinai reaguojančiais su „Murex anti-HBc (total)“ ir daroma prielaida, kad juose yra antikūnų prieš HBc. Tokius mėginius reikia iširti kitais būdais, o šio tyrimo rezultatus reikia nagrinėti su kita klinicine ir (arba) laboratorine informacija. Mėginiai, kurie atlikus kartotinį tyrimą abiejuose šulinėliuose nereagavo, laikytini nereaguojančiais su šiuo tyrimu.

SPECIFINĖS TYRIMO FUNKCIONALUMO CHARAKTERISTIKOS

„Murex anti-HBc (total)“ tyrimo funkcionalumas nustatytas tiriant atsitiktinių imčių būdu atrinktų kraujo donorų, antikūnų prieš hepatito B šerdies antigeną turinčių pacientų ir kitų klinikinių kategorijų pacientų mėginius.

Diagnostikos jautrumas

Buvo iširti 447 bandiniai, paimti iš pacientų, kuriems anksčiau nustatyta antikūnų prieš hepatito B šerdies antigeną, ir nustatyta, kad jei su „Murex anti-HBc (total)“ reagavo. Bandiniai buvo imami iš įvairių stadijų HBV infekcija sergančių pacientų, įskaitant 139 bandinius, kuriuose buvo IgM antikūno prieš hepatito B šerdies antigeną.

Apskaičiuotasis „Murex anti-HBc (total)“ diagnostikos jautrumas šioje bandinių grupėje yra 100% (447/447), o binominio skirstinio apatinė 95% pasikliauties ribinė vertė yra 99,18%.

Diagnostikos specifiškumas

Naudojant „Murex anti-HBc (total)“ tyrimą dar buvo iširta iš viso 360 bandinių, paimtų iš pacientų, turinčių su HBV infekcija nesusijusių būklių ir kuriems ankstesniais tyrimais patvirtintas antikūnų prieš hepatito B šerdies antigeną nebuvimas. Šią grupę sudarė hemolizuoti bandiniai, nėsčiųjų bandiniai, autoimunine liga sergančių pacientų bandiniai ir kitomis ūminėmis virusinėmis infekcijomis sergančių pacientų bandiniai.

Be to, buvo iširtas lipeminių ir ikterinių bandinių panelis ir nustatyta, kad jie su tyrimu nereagavo.

Apskaičiuotasis „Murex anti-HBc (total)“ diagnostikos specifiškumas šioje bandinių grupėje yra 100% (360/360), o apatinė 95% pasikliauties ribinė vertė yra 98,98%.

Specifiškumas naudojant skringui

Naudojant „Murex anti-HBc (total)“ buvo atliktas iš viso 5344 rutininių donorų bandinių skringas dviejuose Europos ir dviejuose Pietų Amerikos kraujo perpilimo centruose. Rezultatų suvestinė pateikiama 3 lentelėje. Šioje studijoje 99,14% (5298/5344) mėginių nereagavo, o 0,86% (46/5344) reagavo pakartotinai. Trisdešimt du kartotinai reagavę bandiniai buvo patvirtinti kaip teigiami, ištyrus ne mažiau nei dviem kitais rinkoje esančiais antikūnų prieš hepatito B šerdies antigeną nustatymo tyrimais. Likusius keturiasdešimt bandinių ištyrus dėl antikūno prieš hepatito B šerdies antigeną buvimą, teigiamų rezultatų patvirtinta nebuvo.

Apskaičiuotasis „Murex anti-HBc (total)“ specifiškumas naudojant neigiamų rutininių donorų bandinių skringui yra 99,74% (5298/5312), o binominio skirstinio 95% pasikliauties ribinė vertė yra nuo 99,86% iki 99,56%.

3 lentelėje

„Murex anti-HBc (total)“ reagavimas su tikėtinais neigiamais rutininių kraujo donorų bandiniais

Centras	Ištirtų rutininių donorų skaičius	Kartotinai reagavusių bandinių skaičius	Patvirtintų teigiamų bandinių skaičius	Klaidingai reagavusių bandinių skaičius
A	1975	9	2	7 (0,35%)
B	2081	10	7	1 (0,05%)
C	608	18	16	2 (0,33%)
D	680	11	7	4 (0,59%)
IŠ VISO	5344	46	32	14 (0,26%)

Tyrimo atkuriamumas

Penkių kokybės užtikrinimo panelių komponentai buvo iširti po dešimt kartotinių keturiais atskirais atvejais, siekiant įvertinti „Murex anti-HBc (total)“ atkuriamumą. Tyrimo rezultatų suvestinė pateikiama 4 lentelėje.

**4 lentelėje
„Murex anti-HBc (total)“ - tyrimo atkuriamumas**

Bandinys	Tyrimų skaičius	Kartotinių skaičius	Kirpinio vertė/vidutinė absorbuojamoji geba	Naudojant vieną tyrimą, VK %	Naudojant kelis tyrimus, VK %
QA01	4	10	0,782	6,1	6,7
QA02	4	10	1,263	6,7	8,9
QA03	4	10	2,672	7,4	8,4
QA04	4	10	2,380	7,3	8,7
QA05	4	10	0,982	5,4	6,3

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Būtina laikytis skyriuose **Tyrimo procedūra** ir **Rezultatų interpretavimas** pateiktų nuorodų.
- Tyrimas buvo įvertintas tik naudojant atskirų individų (ne jungtinio) serumo, plazmos su EDTA arba plazmos su citratu mėginius.
- Neigiami antikūnų nustatymo tyrimo rezultatai neatmeta infekcijos galimybės.
- Teigiamus rezultatus, kurių neįmanoma pakartoti, galima gauti atliekant bet kurią EIA procedūrą.
- Dažniausi klaidų šaltiniai yra:
 - Netikslus mėginio, konjugato arba substrato įpylimas į šulinėlius.
 - Substrato užteršimas konjugatu.
 - Užteršimas konjugatais iš kitų tyrimų.
 - Užsikimšę arba iš dalies užsikimšę plovyklės zondai.
 - Nepakankamas įsiurbimas, dėl ko šulinėliuose liko nedidelis kiekis plovimo skysčio.
 - Prieš plokštelės nuskaitymą nepatikrinus, ar šulinėlių dugnas yra švarus bei sausas ir ar šulinėliuose esančio skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
 - Nepavykęs nuskaitymas tinkamo ilgio bangose arba netinkamo ilgio referencinių bangų naudojimas.
- Naudojant labai hemolizuotus mėginius, ne visiškai sukrešėjusį serumą, plazmos mėginius su fibrinu arba mikrobiologiškai užterštus mėginius gali padaugėti klaidingų rezultatų.
- Šis tyrimas nebuvo įvertintas dėl galimybės naudoti tiriant lavonų mėginius.

LITERATŪRA

- Hoofnagle, J.H.** et al. (1973). Antibody to hepatitis-B-core in man. *Lancet*, **II**, 869.
- Hansson, B.G.** (1977). Persistence of serum antibody to hepatitis B core antigen. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 209.
- Lemon, S.M.** et al. (1981). IgM antibody to hepatitis B core antigen as a diagnostic parameter of acute infection with hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.*, **143**, 803.
- Centres for Disease Control** (1985). Recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. *MMWR*, **34**, No. 45, 681.

Bronidox® ir ProClin® nėra bendrovės DiaSorin prekių ženklai.

 **DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch**
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

EC REP **DiaSorin Italia S.p.A.**
Via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) Italy

C11DS65LT
2022 m. liepos mėn.



DiaSorin Italia S.p.A.UK Branch,
Central Rd, Dartford DA1 5LR, UK
www.diasorin.com
Tel. +44 1322 317949

en

REF 9F80-01 / 05

GE34/36

Revised February, 2024

Murex HBsAg Version 3

Enzyme immunoassay for the detection of hepatitis B surface antigen in human serum or plasma.

The assay is intended to screen individual human donors for the presence of hepatitis B surface antigen or as an aid to the diagnosis of HBV infection.

Customer Service

For additional product information, please contact your local customer service organization.

This instructions for use must be read carefully prior to use. The instructions for use must be carefully followed. Reliability of assay results cannot be guaranteed if there are any deviations from the instructions for use.

IVD

Key to symbols used	
 List Number	 <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device
 Lot Number	 Store at 2-8°C
 Expiration Date	 CAUTION: Consult accompanying documents
 Manufacturer	 Consult instructions for use
	 Keep away from sunlight

See **REAGENTS** section for a full explanation of symbols used in reagent component naming.

INTENDED PURPOSE

Murex HBsAg Version 3 is an enzyme immunoassay for the qualitative detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in human serum or plasma samples. The assay is intended to screen individual human donors for the presence of HBsAg. It is also intended as an aid to the diagnosis of hepatitis B virus (HBV) infection in individuals with or without the symptoms of hepatitis. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use, on either a semi-automated or automated platform.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The HBV is a member of the *Hepadnaviridae*, a family of small, enveloped and primarily hepatotropic DNA viruses. Its small genome (3.2 kb) contains four open reading frames encoding 7 proteins: a secreted dimeric protein (HBV e antigen; HBeAg), a viral capsid protein (HBV core antigen; HBCAg), a reverse transcriptase (HBV Pol/RT), a transcriptional regulator (HBV x antigen, HBx) and, finally, three surface envelope glycoproteins (PreS1, PreS2 and hepatitis B surface antigen) originating from an overlapping open reading frame and representing large, medium and small surface envelope glycoproteins, respectively.¹

HBV replicates and assembles exclusively in hepatocytes with virion release through the cellular secretory pathway. Upon uptake into hepatocytes, its nucleocapsid is transported to the nucleus to release the relaxed-circular DNA (rcDNA) genome. The rcDNA is then converted into covalently closed circular DNA (cccDNA) which serves as a template for viral transcription and production of new rcDNA in a transcription/reverse transcription cycle. Hepatitis B surface (HBs) envelope proteins combine with mature nucleocapsids in the endoplasmic reticulum followed by secretion of the assembled virion into circulation. The production of these HBs proteins greatly exceeds the demand for virion formation. As a result, excessive HBs proteins bind each other and interact with lipids originating from the virion surface to form non-infectious filamentous and spherical subviral particles. These subviral particles are secreted into the systemic circulation and exceed the HBV virion concentrations by a factor of 10^2 to 10^5 . They are antigenic and, hence, are called hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. The HBs protein has the determinant antigenic component important for activating host immunity. HBsAg is found on both these particles and the circulating virions.²

The serum concentration of HBsAg depends on the amount of hepatitis B cccDNA genomes in hepatocytes, the transcriptional activity of these genomes and the host immune response against the virus.³ There are at least nine genotypes of HBV (A to I) on the criterion of at least 8% difference in genome sequences. Genotypes C, F and certain subtypes of genotype A are associated with higher rates of hepatocellular carcinoma. The efficacy of antiviral therapy and HBV vaccination is not affected by the genotype.⁵

There is universal consensus on the use of HBsAg as a marker in the initial assessment of hepatitis B, either for screening asymptomatic high-risk patients or diagnosing patients with symptoms of hepatitis B. HBsAg is the first serological marker to appear after an active infection⁷⁻¹⁰, even if HBV DNA is still undetectable. HBsAg represents the serological landmark of HBV infection and the following organizations recommend HBsAg for diagnosis or screening for HBV infection: the World Health Organization (WHO)⁵, European Association for the Study of the Liver (EASL)¹, Korean Association for the Study of the Liver (KASL)⁴, Asian-Pacific Association for the Study of the Liver (APASL)⁶.

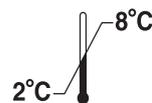
PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

In Murex HBsAg Version 3, the sample is pre-incubated in microwells coated with a mixture of mouse monoclonals specific for different epitopes on the 'a' determinant of HBsAg. Affinity purified goat antibody to HBsAg conjugated to horseradish peroxidase is then added to the sample in the well. During the two incubation steps any HBsAg present in the sample is bound to the well in an antibody-antigen-antibody-enzyme complex. In the absence of HBsAg no conjugate will be bound. After washing to remove sample and unbound Conjugate, a solution containing 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide is added to the wells. Wells which contain HBsAg and hence bound Conjugate will develop a purple colour which is converted to orange when the enzyme reaction is terminated with sulphuric acid.

REAGENTS

DESCRIPTION, PREPARATION FOR USE AND RECOMMENDED STORAGE CONDITIONS

See also **Warnings and precautions**.



All components must be stored at 2 to 8°C, unless otherwise stated, under which condition they will retain activity until the expiry date of the kit.

COATED	WELLS
--------	-------

1. Coated Wells

One plate (9F80-01) or five plates (9F80-05) of 96 wells coated with mouse monoclonal antibody to HBsAg (2.2 µg/mL).

Allow the wells to reach room temperature (18 to 30°C) before removal from the bag. place unused wells in the sealable storage bag provided and return to 2 to 8°C.

SAMPLE	DIL
--------	-----

2. Sample diluent

One bottle containing 16 mL of green/brown buffer containing detergents and proteins of goat and bovine origin. Mix by inversion before use. Contains 0.05% ProClin® 300 preservative.

CONTROL	-	⚠
---------	---	---

3. Negative Control

One bottle containing 2.5 mL of normal human serum. The serum is diluted in a buffer containing protein of bovine origin. Contains 0.05% Bronidox® preservative.

CONTROL	+	⚠
---------	---	---

4. Positive Control

One bottle containing 2 mL of inactivated human serum. The serum is diluted in a buffer containing protein of bovine origin. Contains 0.05% Bronidox® preservative.

CONJUGATE

5. Conjugate

One bottle containing 6 mL (9F80-01) or two bottles each containing 16 mL (9F80-05) of horseradish-peroxidase labelled goat antibody to HBsAg (0.01 mg/mL) in a red buffer containing proteins of bovine and goat origin. Mix by inversion before use. Contains 0.05% ProClin® 300 preservative.

SUBSTRATE DIL

6. Substrate diluent

One bottle containing 35 mL of a colourless solution of tri-sodium citrate and hydrogen peroxide.

SUBSTRATE CONC

7. Substrate Concentrate



One bottle containing 35 mL of 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) and stabilisers in a pink solution.

Substrate Solution

To prepare the Substrate Solution add a volume of colourless Substrate Diluent to an equal volume of pink Substrate Concentrate in either a clean glass or plastic vessel. **It is important that this order of addition is followed and that any pipettes and glassware used to prepare Substrate Solution are clean.** Alternatively, the Substrate Solution may be made by pouring the entire contents of the bottle of Substrate Diluent into the bottle of Substrate Concentrate. One bottle of Substrate Solution provides sufficient reagent for at least five plates - see **Table 1**:

WASH FLUID

Additional reagent may be required for use with automated systems. Keep away from all natural and artificial light. The Substrate Solution should be pink; if it is purple before being used, it should be discarded and fresh Substrate Solution prepared.

The prepared Substrate Solution from this kit may be used interchangeably with that from all other Murex kits which use pink coloured Substrate Concentrate. Ensure that the Substrate Solution is prepared from Substrate Diluent and Substrate Concentrate provided together.

The prepared Substrate Solution is stable refrigerated (2 to 8°C) or at 15 to 25°C for up to two days but must be discarded if crystals have formed.

8. Wash Fluid

One bottle containing 125 mL of 20 times working strength glycine/Borate Wash Fluid. Contains 0.2% Bronidox® preservative.

Add one volume of Wash Fluid Concentrate to 19 volumes of distilled or deionised water to give the required volume or dilute the entire contents of one bottle of Wash Fluid to a final volume of 2500 mL. Crystals may be observed in the Wash Fluid Concentrate but these crystals will dissolve when the Wash Fluid is diluted to working strength. When diluted, the Wash Fluid contains 0.01% Bronidox® preservative.

The Wash Fluid from this kit may be used interchangeably with the glycine/Borate Wash Fluid from any other Murex kit. Store the working strength Wash Fluid at 18 to 30°C in a closed vessel under which conditions it will retain activity for one month.

NOTE: The Wash Fluid may develop a yellow colour on storage. This will have no effect on the performance of the assay providing the Wash Fluid is fully aspirated from the wells.

NOTE: Although the Substrate Solution and Wash Fluid are interchangeable, they must not be used beyond the expiry date printed on the component labels.

**Table 1
Volume of Substrate Concentrate and
Substrate diluent Required**

Number of Wells	No of plates
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 96	1 2 3 4
Substrate Concentrate (mL)	
0.5 1.0 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 6.0	6 12 18 22
Substrate Diluent (mL)	
0.5 1.0 2.0 2.5 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 4.5 6.0	6 12 18 22

WARNINGS AND PRECAUTIONS



The reagents are for *in vitro* diagnostic use only.

For professional use only.

Please refer to the manufacturer's safety data sheet and the product labelling for information on potentially hazardous components.

HEALTH AND SAFETY INFORMATION



CAUTION: This kit contains components of human origin.

The human sera used for manufacture have been screened and found reactive or non-reactive for analytes as shown in **Table 2** below.

Table 2

Component	Reactive for	Non-reactive for
Negative Control	N/A	HBsAg, and antibodies to HIV-1 and 2, HCV and HTLV I + II
Positive Control	HBsAg	Antibodies to HIV-1 and HIV-2, and HCV

All reactive serum used has been inactivated prior to use in reagent preparation. However, all material of human origin should be considered as potentially infectious and it is recommended that this kit and test specimens be handled using established good laboratory practice.

Pursuant to EC Regulation 1272/2008 (CLP) hazardous reagents are classified and labeled as follows:

Reagents:	<input type="text" value="SAMPLE"/> <input type="text" value="DIL"/> · <input type="text" value="CONJUGATE"/>
Classification:	Skin sens. 1 H317
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H317 May cause an allergic skin reaction.
Precautionary Statements:	P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P363 Wash contaminated clothing before reuse. P333+P313 If skin irritation or rash occurs: get medical advice/attention.
Contains:	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).
Reagents:	<input type="text" value="SUBSTRATE"/> <input type="text" value="CONC"/>
Classification:	Eye Irrit. 2 H319
Signal Word:	Warning
Symbols / Pictograms:	
Hazard Statements:	H319 Causes serious eye irritation
Precautionary Statements:	P264 Wash hands thoroughly after handling P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P305+P351+P338 IF IN EYES: rinse cautiously with water for several minutes. remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

Pursuant to EC regulation 1272/2008 (CLP), is labeled as EUH210, safety data sheets available on request.

For additional information see Safety Data Sheets available on www.diasorin.com.

- Potentially contaminated materials should be disposed of safely according to local requirement.
- Spillage of potentially infectious material should be removed immediately with absorbent paper tissue and the contaminated area swabbed with, for example, 1.0% sodium hypochlorite before work is continued¹⁰. Sodium hypochlorite should not be used on acid containing spills unless the spill area is first wiped dry. Materials used to clean spills, including gloves, should be disposed of as potentially biohazardous waste. Do not autoclave materials containing sodium hypochlorite.
- Neutralised acids and other liquid waste should be decontaminated by adding a sufficient volume of sodium hypochlorite to obtain a final concentration of at least 1.0%. A 30 minute exposure to 1.0% sodium hypochlorite may be necessary to ensure effective decontamination.
- Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves and eye protection while handling specimens and performing the assay. Wash hands thoroughly when finished.
- The following reagents contain low concentrations of harmful substances.
 - The Conjugate and Sample Diluent contain detergents.
- Sulphuric acid required for the Stop Solution and hydrochloric acid used for washing glassware are corrosive and should be handled with appropriate care. If either come into contact with the skin or eyes, wash thoroughly with water.
- If any of the reagents come into contact with the skin or eyes wash the area extensively with water.

ANALYTICAL PRECAUTIONS

- Do not use the reagents beyond the stated expiry date. Microbiological contamination of reagents must be avoided as this may reduce the life of the product and cause erroneous results.
- Do not modify the Test procedure or substitute reagents from other manufacturers or other lots unless the reagent is stipulated as interchangeable. Do not reduce any of the recommended incubation times.
- Allow all reagents and samples to come to 18 to 30°C before use. Immediately after use return all reagents to the recommended storage temperature.
- Any glassware to be used with the reagents should be thoroughly washed with 2M hydrochloric acid and then rinsed with distilled water or high quality deionised water.
- Avoid the use of self-defrosting freezers for the storage of reagents and samples.
- Do not expose reagents to strong light or hypochlorite fumes during storage or during incubation steps.
- Do not allow wells to become dry during the assay procedure.
- Do not cross-contaminate reagents. Dedicate a pipette for use with the Substrate Solution of Murex assays. A pipette should also be dedicated for use with the Conjugate.
- Do not touch or splash the rim of the well with Conjugate. Do not blow out from micropipettes; reverse pipetting is recommended wherever possible.
- Ensure that the bottom of the plate is clean and dry and that no bubbles are present on the surface of the liquid before reading the plate.
- Do not contaminate microwells with the dust from disposable gloves.

12. When using fully automated microplate processors:
 - i) It is not necessary to use plate lids and to tap dry the wells.
 - ii) Do not allow system fluids from fully automated microplate processors to contaminate samples or reagents.
 - iii) The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assays on fully automated processors.
13. Ensure the assay is run within the temperature limits defined in the assay protocol.
14. Do not use CO₂ incubators.
15. Do not store the Stop Solution in a shallow dish or return it to a stock bottle after use.
16. The possibility of cross contamination between assays needs to be excluded when validating assay protocols on instrumentation.

SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORT AND STORAGE

SPECIMEN COLLECTION

Serum, EDTA plasma or citrate plasma samples may be used. Blood collected by venepuncture should be allowed to clot naturally. Ensure that the serum samples are fully clotted. Remove any visible particulate matter from the sample by centrifugation. If samples are prepared using liquid anti-coagulants e.g. citrate plasma, the dilution effect should be considered.

SPECIMEN TRANSPORT AND STORAGE

Store samples at 2 to 8°C. Samples not required for assay within 72 hours should be removed from the clot or cell pellet and stored frozen (-15°C or colder). Samples can be freeze-thawed up to four times. Samples may be stored frozen for up to 12 months.¹¹ After thawing, ensure samples are thoroughly mixed before testing.

PROCEDURE

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. **Stop Solution (0.5M to 2M Sulphuric Acid)**. E.g. add between 3 mL (for 0.5M) and 11 mL (for 2.0M) of analytical grade concentrated sulphuric acid (18.0M) to about 80 mL of distilled or deionised water and then make up to 100 mL with more water. Alternatively, the following reagent can be used; 1N Sulphuric Acid (Code N0164, 15 vial pack and N0165, 1 vial pack).
2. **Freshly distilled or high quality deionised water** is required for dilution of Wash Fluid, for preparation of the Stop Solution and for use in conjunction with automated washers.
3. **Micropipettes and Multichannel micropipettes** of appropriate volume.
4. **Incubator** capable of maintaining the temperature limits defined in the assay protocol.
5. **Moulded Heating Block** (Code 5F09-02). For use in laboratory incubators. The moulded heating block should ideally be kept in the incubator used. If this is not possible it must be placed in the incubator at least four hours before beginning the assay.
6. **Instrumentation**
 - a) Automated microplate strip washer.
 - b) Microplate reader.

or

 - c) Fully automated microplate processor.

All instruments must be validated before use. Please contact your representative for details of recommended systems, software protocols for instrumentation and validation procedures.
7. **Disposable Reagent Troughs** (Code 5F24-01).
8. **Sodium hypochlorite** for decontamination (refer to **Health and Safety Information**).

9. **Sodium hydroxide solution (0.1M)** (for instrument decontamination).

TEST PROCEDURE

Please read **Analytical Precautions** carefully before performing the test.

Addition of the various components of the assay to the wells may be confirmed visually by examining the plate for the following colours: **Sample diluent** is green/brown in colour. On addition of the Sample or Control the colour will change to blue/green. The colour change will vary from sample to sample but some change should always be visible.

Conjugate is red in colour.

Substrate Solution is initially pink with any reactive wells becoming purple. On addition of Stop Solution the purple colour of the reactives will change to orange, whilst the negatives remain pink.

The addition of sample or reagent can be confirmed using a microplate reader as follows: Sample Diluent plus Sample read at 570 or 620 nm with a reference at 690 nm, Conjugate at 490 nm with a reference at 690 nm, Substrate Solution at 490 nm (no reference).

SEMI AUTOMATED PROCESSING

Step 1	Prepare Substrate Solution and Wash Fluid .	
Step 2	Use only the number of wells required for the test.	
Step 3	Add 25 µl of Sample diluent to each well.	25 µL
Step 4	Add 75 µl of Samples or Controls to the wells. To each plate add 75 µl of the Negative Control to wells A1 and B1 and 75 µl of positive Control into well C1. Add the Controls to the designated wells after dispensing the samples.	75 µL
Step 5	Cover the plate with a lid and incubate for 60 minutes at 37°C ±1°C.	60 min
Step 6	Add 50 µl of Conjugate to each well.	50 µL
Step 7	Shake the plate using a plate shaker for 10 seconds or manually agitate by gently tapping the sides for 10 seconds.	10 sec
Step 8	Cover the plate with the lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C.	30 min
Step 9	At the end of the incubation time wash the plate 5 times as described under Wash procedures . After washing is completed invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbent paper.	5 washes
Step 10	Immediately after washing the plate, add 100 µl of Substrate Solution to each well.	100 µL
Step 11	Cover the plate with a lid and incubate for 30 minutes at 37°C ±1°C while colour develops. A purple colour should develop in wells containing reactive samples.	30 min
Step 12	Add 50 µl of Stop Solution to each well.	50 µL
Step 13	Within 15 minutes read the absorbance of each well at 450 nm using 620 nm to 690 nm as the reference wavelength if available. Blank the instrument on air (no plate in the carriage).	A_{450/Ref}

2.5. Reagentai yra skirti Hepatito B paviršinio antigeno nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 480 testų. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms yra sunaudojami 3 šulinėliai.

WASH PROCEDURES

Protocols for recommended washers and procedures for verifying washers and analysers can be obtained from your representative. The following protocol is recommended:

- a. **Protocol for automated microplate stripwasher**
Perform 5 wash cycles using working strength Wash Fluid. Ensure, where possible, that:
- Flow-through washing with a fill volume of 500 µl/well is used with instrumentation supplied by DiaSorin. When using other instrumentation for which this is not possible, ensure that the well is completely filled.
 - The dispense height is set to completely fill the well with a slight positive meniscus, without causing an overflow.
 - The time taken to complete one aspirate/wash/soak cycle is approximately 30 seconds.
 - Ensure that no liquid is left in the well (by use of a double aspirate step in the final cycle where possible).
 - After washing is completed, invert the plate and tap out any residual Wash Fluid onto absorbent paper.

NOTE: Do not allow the wells to become dry during the assay procedure.

Washers must be rinsed with distilled water at the end of the test to avoid blockage and corrosion.

FULLY AUTOMATED MICROPLATE PROCESSORS

Contact your representative for details of currently available validated protocols. For instrumentation without established validated protocols, the following guidelines are recommended:

- Do not programme times shorter than specified in the procedure.
- For each incubation at 37°C, programmed times may be increased by up to 20%.
- Wells containing Sample Diluent may be left for up to 60 minutes at 18 to 30°C prior to addition of sample and controls and for up to 60 minutes after the addition of sample and controls before starting **Step 5**.
- Ensure all **Analytical Precautions** are followed. Protocols written following these guidelines must be fully validated prior to use according to local procedures.

RESULTS

CALCULATION OF RESULTS

Each plate must be considered separately when calculating and interpreting results of the assay.

Approved software may be used for calculation and interpretation of results.

Negative Control

Calculate the mean absorbance of the replicates of the Negative Control. If one of the Negative Control wells has an absorbance more than 0.03 above the other discard the higher value.

Cut-off Value

Calculate the *Cut-off Value* by adding 0.05 to the mean of the Negative Control replicates.

Example:

Negative Control absorbance: Well 1 = 0.071
Well 2 = 0.075
Mean Negative Control = $(0.071 + 0.075)/2 = 0.073$
Cut-off Value = $0.073 + 0.05 = 0.123$

QUALITY CONTROL

Results of an assay are valid if the following criteria for the controls are met:

Negative Control

The mean $A_{450/ref}$ of the Negative Control is less than 0.15 or the mean A_{450} of the Negative Control is less than 0.2.

Positive Control

The $A_{450/ref}$ or A_{450} of the Positive Control is more than 0.8 above the mean $A_{450/ref}$ or A_{450} of the Negative Control.

Assays which do not meet these criteria should be repeated.

In the unlikely event of the results repeatedly failing to meet either the Quality Control criteria or the expected performance of the test, please contact your representative.

INTERPRETATION OF RESULTS

Non Reactive Result

Samples giving an absorbance less than the Cut-off Value are considered non-reactive in Murex HBsAg Version 3.

Reactive Result

Samples giving an absorbance equal to or greater than the Cut-off Value are considered initially reactive in the assay (see **Limitations of the Procedure**). Such samples should be retested in duplicate using the original sample source. Samples that are reactive in at least one of the re-tests are presumed to contain HBsAg and should be confirmed by using the Murex HBsAg Confirmatory Version 3 kit (2G27-01) and tests for other HBV markers. Samples that are non-reactive in both wells on retest should be considered non-reactive.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of Murex HBsAg Version 3 has been determined by testing samples from random blood donors, patients with acute and chronic hepatitis B infection, patients with mutant forms of hepatitis B infection and patients with diseases unrelated to hepatitis B infection.

In addition, its performance against the French A.F.S.S.A.P.S. panels and other commercially available seroconversion samples has been evaluated.

1. Diagnostic specificity

The Murex HBsAg assay demonstrated a specificity of $\geq 99.5\%$ in a study where a total of 12330 routine donor samples were screened with Murex HBsAg Version 3. In the study, 0.18% (22/12330) of samples were initially reactive and 0.03% (4/12330) were repeatedly reactive. None of the repeatedly reactive samples with Murex HBsAg version 3 and the alternative assays were confirmed as positive for the presence of hepatitis B surface antigen.

The specificity of Murex HBsAg Version 3 on presumed negative samples from donors is estimated to be 99.97% (12326/12330) with a 95% confidence interval of 99.92% (12320/12330) to 99.99% (12329/12330) by the binomial distribution.

2. Analytical specificity

Cross-reactivity

In addition, 798 potentially cross-reactive samples from patients with conditions unrelated to hepatitis B infection, including other acute viral infections, antenatal and autoimmune samples, were tested with Murex HBsAg Version 3. A total of 796 of these samples were non-reactive with Murex HBsAg Version 3. Of the two repeatedly reactive samples, one was false reactive and showed no other hepatitis markers, the remaining sample was anti-HBc positive.

Table 3
Performance of Murex HBsAg Version 3 with potentially cross-reacting samples

Clinical category	Total
Acute viral infections (hospitalised)	233 (1)
Autoimmune disease (hospitalised)	108
Clinically normal	27
Antenatal	417 (1)
Rheumatoid factor positive	10
Unknown	3
Total	798 (2)

(#) Indicates cross reactive samples

Interference

Controlled studies with potentially interfering substances showed no interference at the concentrations for each substance summarised in Table 4 for the Murex HBsAg version 3.

Table 4
Performance of Murex HBsAg Version 3 with potentially interfering samples

Substance	Result
Indirect bilirubin	No interference at 0.2mg/mL
Triglycerides	No interference at 30mg/mL
Heparin	No interference at 40 USP/mL
Cholesterol	No interference at 5mg/mL
Total protein	No interference between 40-120 mg/mL
Red blood cells	No interference
Interferon alpha 1	No interference at 6000 IU/mL
Interferon alpha 2a	No interference at 6000 IU/mL
Interferon alpha 2b	No interference at 6000 IU/mL
Acetaminophen	No interference at 207 mg/L
Ibuprofen	No interference at 512 mg/L
Adefovir dipivoxil	No interference at 10 mg/L
Telbivudine	No interference at 600 mg/L
Lamivudine	No interference at 1.05 mg/dL
Entecavir	No interference at 0.5 mg/L

NB*100 mg/dL=1 mg/mL

3. Diagnostic sensitivity

Samples from patients at various stages of hepatitis B infection and patients with conditions unrelated to hepatitis B were tested in three regional virus reference laboratories and at DiaSorin.

A total of 584 samples from patients suffering from acute and chronic hepatitis B infection were tested with Murex HBsAg version 3. All 584 samples were confirmed with an alternative immunoassay for HBsAg and found to be positive in both assays.

A panel of ten (10) recombinant mutants were tested with the Murex HBsAg version 3 and three comparator CE-marked assays to determine correct antigenic detection of the HBsAg structure. The mutants contained important epitope clusters within amino acids 100-160, that includes the "a determinant region" (amino acids 124-147), the most important target for serological diagnosis. Eight of ten recombinant mutants were recognised with Murex HBsAg, comparable with, or better than, the competitor assays.

Table 5
Performance Murex HBsAg Version 3 with recombinant mutants

Sample ID	Mutation	Comparator HBsAg assay ¹²			Murex, data from Poster 1 ¹²
		1	2	3	
Mutant-01	T123N	+	+	+	+
Mutant-02	T123N-T124S	-	-	-	-
Mutant-03	P142L-F/Y143H-D144E-G145R	+	-	-	-
Mutant-04	I110R-SS117I-G119R-T123N	+	+	-	+
Mutant-05	I22+DT	+	+	-	+
Mutant-06	I22+DT-G145R	-	+	-	+
Mutant-07	G145R	+	+	+	+
Mutant-08	D114A	+	+	+	+
Mutant-09	P142L-G145R	+	+	+	+
Mutant-10	P142S-G145R	+	+	+	+

Note: '+' and '-' indicate reactive and non-reactive respectively

A further five samples from patients infected with mutant forms of hepatitis B infection, confirmed by DNA sequencing, were also tested with Murex HBsAg version 3 and were all detected successfully.

Additionally, a total of 33 commercially available HBV seroconversion panels were tested with Murex HBsAg Version 3. Comparison with four other commercially available microplate based immunoassays for the detection of hepatitis B surface antigen showed that Murex HBsAg Version 3 detected HBsAg comparably to the other commercial available immunoassays.

4. Analytical sensitivity

Murex HBsAg Version 3 was tested with the WHO Third International Standard for HBsAg, (HBV genotype B4, subtypes ayw1/adw2), NIBSC code 12/226, and it was determined that it was detectable to a limit of 0.023IU/mL.

5. Assay Repeatability and Reproducibility

Ten replicates of each of five samples were tested on ten separate test occasions with two separate batches to ascertain the reproducibility of Murex HBsAg Version 3. The results of the study are summarised in Table 6 and Table 7.

Table 6
Murex HBsAg Version 3 - Assay Repeatability and Reproducibility (Kit 1)

Specimen	Number of assay	Mean S/CO	Intra assay %CV	Inter assay %CV
1	10	9.26	7.6	10.0
2	10	3.56	8.2	10.8
3	10	12.28	10.0	13.1
4	10	1.88	9.3	12.4
5	10	0.69	11.0	14.2

Table 7
Murex HBsAg Version 3 - Assay Repeatability and Reproducibility (Kit 2)

Specimen	Number of assay	Mean S/CO	Intra assay %CV	Inter assay %CV
1	10	10.46	6.8	8.1
2	10	3.89	7.2	9.2
3	10	12.22	7.7	9.5
4	10	1.80	9.3	13.1
5	10	0.58	7.4	7.9

Representative performance data are shown: results obtained at individual laboratories and with different populations may vary.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. The **Test Procedure** and **Interpretation of Results** must be followed.
2. This test has only been evaluated for use with individual (unpooled) serum, EDTA plasma, or citrate plasma samples.
3. A negative result with an antigen detection test does not preclude the possibility of infection.
4. Non-repeatable reactive results may be obtained with any EIA procedure.
5. The most common sources of error are:
 - a) Imprecise delivery of Sample, Conjugate or Substrate into the wells.
 - b) Contamination of Substrate with Conjugate.
 - c) Contamination with conjugates from other assays
 - d) Blocked or partially blocked washer probes.
 - e) Insufficient aspiration leaving a small volume of Wash Fluid in the wells.
 - f) Failure to ensure that the bottom surface of the wells is clean and dry, and that no air bubbles are present on the surface of the liquid in the wells before a plate is read.
 - g) Failure to read at the correct wavelength or use of an incorrect reference wavelength.
6. The use of highly haemolysed samples, **samples containing human anti-mouse antibody**, incompletely clotted sera, plasma samples containing fibrin or samples with microbial contamination may give rise to erroneous results.
7. This test has not been evaluated for use with samples from cadavers.

Summary of safety and performance is available on EUDAMED.

For EU only: Please be aware that any serious incident that has occurred in relation to this IVD medical device shall be reported to DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch and the Competent Authority of the EU Member State in which the user and/or the patient is established.

BIBLIOGRAPHY

1. EASL. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. s.l.: **European Association for the Study of the Liver**. Electronic address, e.e.e.& European Association for the Study of the Liver, L. EASL, 2017. J Hepatol 67, 370-398. (2017).
2. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis B infection: providing insight into the next generation of disease. **Bayliss, J. Nguyen, T., Lesmana, C.R., Bowden, S. & Revill, P.** 113-121, 2013, Vol. Semin Liver Dis. 33.
3. Management of chronic hepatitis B: Canadian Association for the Study of the Liver consensus guidelines. **Coffin, C.S., Fung, S.K. & Ma, M.M.** 917-938, s.l.: Can J. Gastroenterol, 2012, Vol. 26.
4. KASL, Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. (**KASL**), **Korea Association of the Study of the Liver**. 18-75, s.l.: Clin Mol Hepatol, 2016, Vol. 22.
5. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. **Organization, World Health**. s.l.: WHO, 2015.
6. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. **Sarin, S.K. et al.** 1-98, s.l.: Hepatol. Int., 2016, Vol. 10.
7. SASLT practice guidelines for the management of hepatitis B virus. **Abaalkhail, F. et al.** 5-25, s.l.: Saudi J Gastroenterol, 2014, Vol. 20.
8. Updated CDC recommendations for the management of hepatitis B virus-infected health-care providers and students. (CDC), **Centers for Disease Control and Prevention**. 1-12, s.l.: MMWR Recomm Rep, 2012, Vol. 61.
9. South African guideline for the management of chronic hepatitis B. **Spearman, C.W. et al.** 337-349, s.l.: S Afr Med J, 2013, Vol. 103.
10. **Centres for disease Control**. (1985). recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. MMWR, 34, No. 45, 681.
11. **Fung, J. et al.** (2011). Stability of hepatitis B surface antigen over time: Implications for studies using stored sera. Journal of Medical Virology, 83(11), 1900–1904.
12. Sarasso C. et al. A Novel Panel of Recombinant Hepatitis B Surface Antigens Mutants. Source: https://www.diasorin.com/sites/default/files/rd/publications/attachments/poster_lsn_xl_hbsag_q_escv_2010_sarasso.pdf.

Bronidox® and ProClin® are not trademarks of DiaSorin.



DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123



DiaSorin Italia S.p.A.
via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) - Italy

F01DS34GB

February, 2024

Peržiūrėta 2024 m.
vasario mėn.

Murex HBsAg Version 3

Imunofermentinis tyrimas, skirtas nustatyti hepatito B paviršiaus antigeną žmogaus serume arba plazmoje.

Šis tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrankai atsižvelgiant į hepatito B paviršiaus antigeno buvimą arba kaip HBV infekcijos diagnostikos priemonė.

Klientų aptarnavimas

Dėl papildomos informacijos apie produktą susisieki su vietos klientų aptarnavimo organizacija.

Prieš naudojimą reikia atidžiai perskaityti šias naudojimo instrukcijas. Būtina rūpestingai laikytis naudojimo instrukcijų. Esant nukrypimui nuo naudojimo instrukcijų, tyrimo rezultatų patikimumo garantuoti negalima.

IVD

Pagrindiniai naudojami simboliai

	Sąrašo numeris		<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos prietaisai
	Serijos numeris		Laikyti 2-8°C temperatūroje
	Galiojimo terminas		ATSARGIAI. Žr. pridėtus dokumentus
	Gamintojas		Žr. naudojimo instrukcijas
			Saugoti nuo saulės šviesos

Reagento komponentų pavadinimuose naudojamų simbolių išsamų paaiškinimą galite rasti skyriuje **REAGENTAI**.

NUMATYTOJI PASKIRTIS

„Murex HBsAg Version 3“ – tai imunofermentinis kokybinis tyrimas, skirtas hepatito B paviršiaus antigenui (HBsAg) žmogaus serumo arba plazmos mėginiuose nustatyti. Tyrimas skirtas naudoti individualių žmonių donorų atrenkamajam tikrinimui dėl HBsAg buvimo. Jis taip pat skirtas naudoti kaip hepatito B viruso (HBV) infekcijos diagnostikos priemonė asmenims, turintiems ir neturintiems hepatito simptomų. Šis tyrimas skirtas *in vitro* diagnostikai psiausiai automatinėje arba automatinėje platformoje.

SANTRAUKA IR TYRIMO PAAIŠKINIMAS

HBV priklauso *Hepadnaviridae* virusams – tai mažų, apvalkalėtųjų ir dažniausiai kepenis pažeidžiančių DNR virusų šeima. Jo mažą genomą (3,2 kb) sudaro keturi atviri nuskaitymo rėmeliai, koduojantys 7 baltymus: išskiriamą dimerinį baltymą (HBV e antigeną, HBeAg), viruso kapsidės baltymą (HBV šerdies antigeną, HBcAg), atvirkštinę transkriptazę (HBV Pol/RT), nurašymo (transkripcijos) reguliatorių (HBV x antigeną, HBx) ir, galiausiai, tris paviršinius apvalkalo glikoproteinus (PreS1, PreS2 bei hepatito B paviršiaus antigeną), kilusius iš persidengiančio atviro nuskaitymo rėmelio ir atitinkamai reprezentuojančius didelius, vidutinius ir mažus apvalkalo glikoproteinus.¹

HBV replikuoja ir susidaro tik kepenų ląstelėse (hepatocituose), o virionai išsiskiria ląstelių sekrecijos būdais. Virusui patekus į kepenų ląstelę, jo nukleokapsidė patenka į branduolį, kur išleidžia atvirosios žiedinės DNR (ažDNR) genomą. Tada ažDNR konvertuojama į kovalentiškai uždara žiedinę DNR (kužDNR), kuri naudojama kaip šablonas naujos viruso ažDNR nurašymui (transkripcijai) ir gamybai nurašymo / atbulinio nurašymo ciklo metu. Hepatito B paviršiaus (HBs) apvalkalo baltymai jungiasi su subrendusiomis nukleokapsidėmis endoplazminiame tinkle, o paskui į kraujotaką išsiskiria susidaręs virionas. Šių HBs baltymų susidaro daug daugiau, nei reikia virionams formuoti, todėl pertekliniai HBs baltymai rišasi tarpusavyje ir sąveikauja su virionų paviršiaus kilmės lipidais, sudarydami neinfekcines siūlines ir rutulines subvirusines daleles. Šios subvirusinės dalelės išskiriamos į sisteminę kraujotaką ir viršija HBV virionų koncentraciją koeficientu nuo 10² iki 10⁵. Jos antigeniškos, todėl vadinamos hepatito B paviršiaus antigeno (HBsAg) dalelėmis. HBs baltymą sudaro determinuojantis antigeninis komponentas, kuris svarbus suaktyvinant šeimininko imunitetą. HBsAg rasta ir ant šių dalelių, ir ant kraujotakoje cirkuliuojančių virionų².

HBsAg koncentracija serume priklauso nuo hepatito B kužDNR genomų kiekio kepenų ląstelėse, šių genomų nurašymo aktyvumo ir šeimininko organizmo imuninio atsako į virusą³. Pagal bent 8 % geno sekų skirtumo kriterijų skiriami bent devynių genotipų HBV (nuo A iki I). Genotipai C, F ir tam tikri genotipo A potipiai siejami su didesniu hepatoceliulinės karcinomos dažniu. Antivirusinio gydymo ir HBV vakcinacijos veiksmingumas nuo genotipo nepriklauso⁵.

Visuotinai pripažintu bendruoju sutarimu HBsAg naudojamas kaip pradinis žymuo vertinant hepatitą B, atrenkant nesimptominius didelės rizikos grupės pacientus arba diagnozuojant pacientus, turinčius hepatito B simptomų. HBsAg – tai pirmasis serologinis žymuo, atsirandantis po aktyvios infekcijos⁷⁻¹⁰, net jeigu dar negalima aptikti HBV DNR. HBsAg laikomas serologiniu HBV infekcijos orientyru; HBsAg naudoti HBV infekcijos diagnostikai arba atrenkamajam tikrinimui rekomenduoja šios organizacijos: Pasaulio sveikatos organizacija (PSO)⁵, Europos kepenų tyrimų asociacija (EASL)¹, Korėjos kepenų tyrimų asociacija (KASL)⁴, Azijos ir Ramiojo vandenyno kepenų tyrimų asociacija (APASL)⁶.

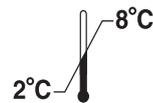
PROCEDŪROS PRINCIPAS

Atliekant „Murex HBsAg Version 3“ tyrimą mėginys iš pradžių inkubuojamas mikrošulinėliuose, padengtuose pelės monoklonų, kurie yra specifiniai skirtingiems HBsAg „a“ determinantės epitopams. Tada į mėginį šulinėlyje įpilama pagal afiniškumą išgryninto ožkų antikūno prieš HBsAg, konjuguoto su krienų peroksidaze. Dviejų inkubavimo fazių metu mėginyje esantis HBsAg susiriša su šulinėlio reagentais į antikūno-antigeno-antikūno-fermento kompleksą. Jeigu HBsAg nėra, konjugatų nesusidarys. Po plovimo pašalinus mėginį ir nesusijungusio konjugato likučius, į šulinėlius įpilama tirpalo su 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidinu (TMB) ir vandenilio peroksidu. Šulinėliai, kuriuose yra HBsAg (ir todėl yra susijungusio konjugato), nusidažo violetine spalva, o nutraukus fermentavimo reakciją sieros rūgštimi – oranžine spalva.

REAGENTAI

APRAŠYMAS, PARUOŠIMAS NAUDOTI IR REKOMENDUOJAMOS LAIKYMO SĄLYGOS

Taip pat žr. **Įspėjimai ir atsargumo priemonės.**



Visus komponentus reikia laikyti nuo 2 iki 8°C temperatūroje, jei nenurodyta kitaip; tokiomis sąlygomis jie išlieka aktyvūs iki rinkinio tinkamumo naudoti datos.

COATED	WELLS
--------	-------

1. Dengti šulinėliai

Viena plokštelė (9F80-01) arba penkios plokštelės (9F80-05), kuriose yra po 96 šulinėlius, dengtus monokloniniais antikūnais prieš HBsAg (2,2 µg/mL). Prieš išimdami iš maišelio palaukite, kol šulinėliai sušils iki kambario temperatūros (nuo 18 iki 30°C). Nenaudojamus šulinėlius sudėkite į kartu tiekiamą uždaromą maišelį ir laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje.

SAMPLE	DIL
--------	-----

2. Mėginių skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 16 mL žaliai rudo buferio su ožkų ir galvijų kilmės baltymais. Prieš naudojimą sumaišykite vartydami. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „ProClin® 300“.

CONTROL	-	⚠
---------	---	---

3. Neigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 2,5 mL norminio žmogaus serumo. Serumai skiedžiamas buferiu su galvijų kilmės baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONTROL	+	⚠
---------	---	---

4. Teigiama kontrolės medžiaga

Vienas butelis, kuriame yra 2 mL inaktyvinto žmogaus serumo. Serumai skiedžiamas buferiu su galvijų kilmės baltymais. Sudėtyje yra 0,05% konservanto Bronidox®.

CONJUGATE

5. Konjugatas

Vienas buteliukas, kuriame yra 6 mL (9F80-01) arba du buteliukai, kuriuose yra po 16 mL (9F80-05) krienų peroksidaze žymėtų ožkų antikūnų prieš HBsAg (0,01 mg/mL), pateikiamų raudoname buferyje su galvijų ir ožkų kilmės baltymais. Prieš naudojant sumaišyti variant. Sudėtyje yra 0,05% konservanto „ProClin® 300“.

SUBSTRATE DIL

6. Substrato skiediklis

Vienas butelis, kuriame yra 35 mL bespalvio trinatrio citrato ir vandenilio peroksido tirpalo.

SUBSTRATE CONC

7. Substrato koncentratas



Vienas butelis, kuriame yra 35 mL 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidino (TMB) ir stabilizatorių rožiniame tirpale.

Substrato tirpalas

Norėdami paruošti substrato tirpalą, bespalvio substrato skiediklio pripilkite į tokio paties tūrio rožinį substrato koncentratą švarioje stiklinėje arba plastikiniame inde.

Svarbu laikytis šios įpylimo eilės tvarkos, o visos pipetės ir stikliniai indai, naudojami ruošti substrato tirpalą, turi būti švarūs. Alternatyviai substrato tirpalą galima pagaminti supilant visą substrato skiediklio butelio turinį į substrato koncentrato butelį. Viename substrato tirpalo butelyje esančio reagento pakanka ne mažiau nei penkioms plokštelėms – žr. 1 lentelę.

1 lentelė

Reikiamas substrato koncentrato ir substrato skiediklio kiekis

Šulinėlių skaičius	Plokštelių skaičius
8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 96	1 2 3 4
Substrato koncentratas (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22
Substrato skiediklis (mL)	
0,5 1,0 2,0 2,5 2,5 3,0 3,5 4,0 4,5 4,5 6,0	6 12 18 22

Naudojant su automatinėmis sistemomis gali reikėti papildomo reagento. Saugoti nuo visų natūralios ir dirbtinės šviesos šaltinių. Substrato tirpalas turėtų būti rožinis; jeigu prieš naudojimą jis yra violetinis, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą.

WASH FLUID

Substrato tirpalas turėtų būti rožinis; jeigu prieš naudojimą jis yra violetinis, jį reikia išmesti ir paruošti naują substrato tirpalą. Užtikrinkite, kad substrato tirpalas būtų ruošiamas iš viename rinkinyje esančių substrato skiediklio ir substrato koncentrato.

Paruoštas substrato tirpalas, laikomas šaldytuve (nuo 2 iki 8°C temperatūroje) arba nuo 15 iki 25°C temperatūroje, išlieka stabilus ne daugiau nei dvi dienas, tačiau jį reikia išmesti, jeigu susidaro kristalai.

8. Plovimo skystis

Vienas butelis, kuriame yra 125 mL 20 kartų koncentruoto glicino/borato plovimo skysčio. Sudėtyje yra 0,2% konservanto Bronidox®. Vieną dalį koncentruoto plovimo skysčio įpilkite į 19 dalių distiliuoto arba dejonizuoto vandens, kad gautumėte reikiamą tūrį, arba praskieskite visą vieno plovimo skysčio butelio turinį, kad gautumėte 2500 mL galutinio tirpalo. Plovimo skysčio koncentrate gali būti kristalų, tačiau šie kristalai ištirps, kai plovimo skystis bus praskiestas iki darbinio stiprumo. Praskiestame plovimo skystyje yra 0,01% konservanto Bronidox®.

Vietoj šio rinkinio plovimo skysčio galima naudoti bet kurio kito „Murex“ rinkinio glicino/borato plovimo skystį.

Darbinio stiprumo plovimo skystį laikykite 18-30°C temperatūroje uždare inde. Tokiomis sąlygomis jis išliks aktyvus vieną mėnesį.

PASTABA. laikant, plovimo skystis gali pagelsti. Tai neturės įtakos tyrimo atlikimui su sąlyga, kad plovimo skystis bus visiškai išsiurbtas iš šulinėlių.

PASTABA. nors substrato tirpalas ir plovimo skystis yra keičiami, jų negalima naudoti pasibaigus galiojimo terminui, išspausdintam ant komponentų etiketės.

ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS



Reagentai skirti tik *in vitro* diagnostikai.

Tik profesionaliam naudojimui.

Informaciją apie potencialiai pavojingus komponentus galite rasti gamintojo saugos duomenų lape ir gaminio žymėjime.

SVEIKATOS IR SAUGOS INFORMACIJA



ATSARGIAI. Šiame rinkinyje yra žmogaus kilmės komponentų.

Gamybai naudojamas žmogaus serumas buvo patikrintas ir nustatytas jo reagavimas arba nereagavimas su analizėmis, kaip nurodyta 2 lentelėje toliau.

2 lentelė

Komponentas	Reagavo su	Nereagavo su
Neigiamą kontrolės medžiaga	Netaikytina	HBsAg, antikūnais su ŽIV-1 ir ŽIV-2, HCV ir ŽTLV I + II
Teigiama kontrolės medžiaga	HBsAg	antikūnais prieš ŽIV-1 ir ŽIV-2 bei HCV

Prieš naudojimą reagento ruošimui, visi naudojami reagentai serumo mėginiai buvo inaktyvinti. Nepaisant to, visas žmogaus kilmės medžiagas reikia laikyti potencialiai infekcinėmis ir su šiuo rinkiniu bei tiriamaisiais bandiniais reikia dirbti laikantis nustatytos geros laboratorinės praktikos.

Atsižvelgiant į Reglamentą (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) pavojingi reagentai klasifikuojami ir pažymėti taip:

Reagentai:	<input type="checkbox"/> SAMPLE <input type="checkbox"/> DIL <input type="checkbox"/> CONJUGATE
Klasifikacija:	Skin Sens. 1H317
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojingumo frazės:	H317 gali sukelti alerginę odos reakciją.
Atsargumo frazės:	P280 mėvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P363 užterštus drabužius išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. P333+P313 jeigu sudirginama oda arba ją išberia: Kreiptis į gydytoją.
Sudėtis:	Reakcijos masė: 5-chlor-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (EB Nr. 247-500-7) ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas (EB Nr. 220-239-6) (3:1).
Reagentai:	<input type="checkbox"/> SUBSTRATE <input type="checkbox"/> CONC
Klasifikacija:	Eye Irrit. 2 H319
Signaliniai žodžiai:	Įspėjimas
Simboliai / piktogramos:	
Pavojingumo frazės:	H319 sukelia smarkų akių dirginimą
Atsargumo frazės:	P264 po naudojimo kruopščiai nusiplauti rankas. P280 mėvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P305+P351+P338 PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

Remiantis Reglamentu (EB) Nr. 1272/2008 (CLP) WASH FLUID pažymėtas fraze EUH210 (saugos duomenų lapus galima gauti paprašius).

Papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose, esančiuose interneto svetainėje www.diasorin.com

- Potencialiai kontaminuotas medžiagas reikia šalinti saugiai pagal vietos reikalavimus.
- Išsiliejus galimai pavojingoms medžiagoms, jas reikia nedelsiant surinkti absorbuojančio popieriaus audiniu, o užterštą vietą prieš tęsiant darbą reikia nuvalyti, pavyzdžiui, 1,0% natrio hipochloritu¹⁰. Natrio hipochlorito negalima naudoti išsiliejus medžiagoms, kurių sudėtyje yra rūgšties, išsiliejimo vietos prieš tai sausai nenušluosčius. Išsiliejusioms medžiagos valyti naudojamos priemonės, įskaitant pirštines, turi būti utilizuojamos kaip potencialiai biologiškai pavojingos atliekos. Neautoklavuokite medžiagų, kurių sudėtyje yra natrio hipochlorito.

- Neutralizuotas rūgštis ir kitas skystas atliekas reikia nukenksminti pridėdam pakankamą kiekį natrio hipochlorito, kad galutinę koncentraciją būtų mažiausiai 1,0%. Kad nukenksminimas būtų veiksmingas, gali prireikti palikti 1,0% natrio hipochlorito tirpalą 30 minučių.
- Nepipetuokite burna. Naudodami mėginius ir atlikdami tyrimą dėvėkite vienkartines pirštines ir akių apsaugą. Pabaigę, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Šių reagentų sudėtyje yra nedidelės koncentracijos kenksmingų medžiagų.
 - Konjugate ir mėginių skiediklyje yra detergentų ir saponino.
- Stabdymo tirpalui reikalinga sieros rūgštis ir stiklinėms priemonėms plauti naudojama druskos rūgštis yra korozinės ir jas reikia naudoti atitinkamai atsargiai. Jeigu kuri nors iš jų pateko ant odos arba į akis, kruopščiai nuplaukite vandeniu.
- Jeigu kurio nors reagento pateko ant odos arba į akis, nuplaukite dideliu kiekiu vandens.

ANALIZĖS ATSARGUMO PRIEMONĖS

- Pasibaigus nurodytam galiojimo terminui, reagentų nenaudokite. Reikia vengti mikrobiologinio reagentų užteršimo, nes tai gali sumažinti produkto tarnavimo laiką ir dėl to gauti rezultatai gali būti klaidingi.
- Nekeiskite **Tyrimo procedūros** ir nepakeiskite reagentų kitų gamintojų ar kitos partijos reagentais, nebent nurodyta, kad reagentas keičiamas. Netrumpinkite nurodytos inkubacijos trukmės.
- Prieš naudojimą visus reagentus ir mėginius palaikykite 18-30°C temperatūroje. Iškart po naudojimo, visus reagentus grąžinkite į rekomenduojamą laikymo temperatūrą.
- Su reagentais naudojamas stiklines priemonės reikia kruopščiai išplauti 2M druskos rūgštimi ir po to išskalauti distiliuotu arba labai kokybišku dejonizuotu vandeniu.
- Nelaikykite reagentų ir mėginių šaldikliuose su automatinio atitirpdymo funkcija.
- Laikymo metu ar inkubacijos etape reagentų neveikite ryškia šviesa ar hipochlorito garais.
- Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.
- Neužterškite vieno reagentų kitais. Naudoti su „Murex“ analizės substrato tirpalu paskirkite atskirą pipetę. Reikia skirti vieną pipetę naudoti su konjugatu.
- Nepalieskite ir neaptaškykite šulinėlio krašto konjugatu. Nepūskite skysčių iš mikropipetėčių; jeigu įmanoma, rekomenduojama naudoti reversinį pipetavimą.
- Prieš nuskaitydami plokštelę patikrinkite, ar plokštelės dugnas yra švarus ir sausas, ir ar skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
- Neužterškite mikrošulinėlių dulkelėmis nuo vienkartinų pirštinių.
- Visiškai automatinų mikroplokštelių procesorių naudojimas
 - Nebūtina naudoti plokštelių dangtelių ir sausai iššluostyti šulinėlių.
 - Neleiskite sistemos skysčiams iš visiškai automatizuotų mikroplokštelių procesorių užteršti mėginių ar reagentų.
 - Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimai visiškai automatizuotuose procesoriuose.
- Užtikrinkite, kad tyrimas būtų atliekamas temperatūros ribose, nurodytose tyrimo protokole.
- Nenaudokite CO₂ inkubatorių.
- Nelaikykite stabdymo tirpalo sekliame inde ir po naudojimo nesupilkite jo atgal į atsargų butelį.
- Reikia atmesti kryžminio tyrimų užteršimo galimybę, kai tikrinami tyrimo su instrumentais protokolai.

BANDINIŲ ĖMIMAS, TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

BANDINIŲ ĖMIMAS

Galima naudoti serumo, plazmos su EDTA arba plazmos citratu mėginius. Iš venos paimtam kraujui reikia leisti sukrešėti natūraliai. Užtikrinkite, kad serumo mėginiai būtų visiškai sukrešę. Pašalinkite iš mėginio visas matomas daleles centrifuguodami. Jeigu mėginiai paruošti naudojant skystus antikoagulantus (pvz., plazma su citratu), reikia apsvarstyti skiedimo poveikį.

BANDINIŲ TRANSPORTAVIMAS IR LAIKYMAS

Mėginius laikykite nuo 2 iki 8°C temperatūroje. Jeigu mėginių nereikia tirti per 72 valandas, juos reikia atskirti nuo krešulio arba lašelių agregatų ir laikyti užšaldytus (-15°C arba žemesnėje temperatūroje). Mėginius galima užšaldyti ir atšildyti ne daugiau nei keturis kartus. Mėginius galima laikyti užšaldytus ne ilgiau kaip 12 mėnesių.¹¹ Atšildę užtikrinkite, kad mėginiai prieš tyrimą būtų kruopščiai išmaišyti.

PROCEDŪRA

NEPATEIKTOS, TAČIAU REIKALINGOS MEDŽIAGOS

- Sustabdymo tirpalas (nuo 0,5M iki 2M koncentracijos sieros rūgštis)**, pvz., nuo 3 mL (0,5M tirpalui) iki 11 mL (2,0M tirpalui) laboratorinės paskirties koncentruotos sieros rūgštis (18,0M) įpilkite į maždaug 80 mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens, po to papildykite vandens iki 100 mL bendrojo tūrio. Alternatyviai galima naudoti šį reagentą: 1N koncentracijos sieros rūgštį (kodas N0164, 15 flakonų pakuotė, ir N0165, 1 flakono pakuotė).
- Plovimo skysčiui praskiesti, sustabdymo tirpalui paruošti ir naudoti kartu su automatinėmis plovyklėmis reikia **šviežiai distiliuoto arba labai kokybiško dejonizuoto vandens**.
- Atitinkamo tūrio **mikropipetės ir daugiakanalės mikropipetės**.
- Inkubatorius**, galintis palaikyti tyrimo protokole nurodyto diapazono temperatūrą.
- Forminis šildymo blokas** (kodas 5F09-02). Skirtas naudoti laboratorijos inkubatoriuose. Geriausia forminį šildymo bloką laikyti naudojamame inkubatoriuje. Jeigu tai neįmanoma, jį reikia įdėti į inkubatorių ne mažiau nei keturias valandas iki tyrimo pradžios.
- Instrumentai**
 - Automatinė mikroplokštelių juostų plovyklė,
 - Mikroplokštelių skaitytuvas arba
 - Visiškai automatinis mikroplokštelių procesorius.Prieš naudojimą reikia patikrinti visų instrumentų tinkamumą naudoti.
Išsamios informacijos apie rekomenduojamas instrumentų ir tinkamumo įvertinimo procedūrų sistemas ir programinės įrangos protokolus kreipkitės į vietos atstovybę.
- Vienartiniai reagentų loveliai**. (Kodas 5F24-01).
- Natrio hipochloritas** dekontaminacijai. (Žr. skyrių **Sveikatos ir saugos informacija**).
- Natrio hidroksido tirpalas** (0,1M). (Instrumentų dekontaminacijai).

TYRIMO PROCEDŪRA

Prieš atlikdami tyrimą atidžiai perskaitykite skyrių **Analizės atsargumo priemonės**.

Įvairių tyrimo komponentų įpylimą į šulinėlius galima patvirtinti plika akimi patikrinant plokštelę, ar spalvos yra kaip nurodyta:

Mėginių skiediklis yra žaliai rudos spalvos. Pridėjus mėginio ar kontrolės, spalva pasikeis į mėlyną/žalią. Skirtingų mėginių spalvos kis įvairiai, tačiau visada turi būti matomas pokytis.

Konjugatas yra raudonos spalvos.

Substrato tirpalas iš pradžių yra rožinis, o reaguojančiuose šulinėliuose tampa violetinis.

Pridėjus stabdymo tirpalo, violetinė reaguojančių šulinėlių spalva pakinta į oranžinę, o nereaguojančių šulinėlių lieka rožinė.

Mėginio ar reagento pridėjimą galima patvirtinti naudojant mikroplokštelių skaitytuvą: mėginių skiediklis su mėginiu nuskaitomas 570 nm arba 620 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), konjugatas nuskaitomas 490 nm bangų ruože (kai referencinė banga 690 nm ilgio), o substrato tirpalas – 490 nm bangų ruože (referencijos nėra).

PUSIAU AUTOMATINIS APDOROJIMAS

1 veiksmas	Paruoškite substrato tirpalą ir plovimo skystį .
2 veiksmas	Naudokite tik tyrimui būtiną šulinėlių kiekį .
3 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 25 µL mėgi- 25 µL nių skiediklio .
4 veiksmas	Į šulinėlius įpilkite po 75 µL mėginio 75 µL arba kontrolės medžiagų . Į kiekvienos plokštelės A1 ir B1 šulinėlius įpilkite 75 µL neigiamos kontrolės medžiagos, o į šulinėlį C1 – 75 µL teigiamos kontrolės medžiagos. Padalinę mėginius, kontrolės medžiagas įpilkite į tam skirtus šulinėlius.
5 veiksmas	Plokštelę uždenkite dangteliu ir inku- 60 min buokite 60 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje.
6 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL konju- 50 µL gato .
7 veiksmas	Sukratykite plokštelę plokštelių vibratoriumi 10 sekundžių arba rankiniu būdu atsargiai pabelsdami šonus 10 sekundžių.
8 veiksmas	Plokštelę uždenkite dangteliu ir inku- 30 min buokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje.
9 veiksmas	Baigusis inkubacijos periodui plokštelę 5 plovimai išplaukite 5 kartus, kaip aprašyta skyriuje mai Plovimo procedūros . Baigę plovimą, apverskite plokštelę ir nuvarinkite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.
10 veiksmas	Iš karto po plokštelės plovimo į kiekvieną 100 µL šulinėlį įpilkite 100 µL substrato tirpalo .
11 veiksmas	Plokštelę uždenkite dangteliu ir inku- 30 min buokite 30 minučių 37°C ± 1°C temperatūroje, kol išryškės spalva. Šulinėliai, kuriose yra reaguojančių mėginių, turi nusidažyti violetine spalva.
12 veiksmas	Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µL sustab- 50 µL dymo tirpalo .
13 veiksmas	15 minučių laikotarpyje nuskaitykite kie- A_{450/Ref} kvieno šulinėlio absorbuojamą gebą 450 nm bangų ruože; jeigu yra, referencijai naudokite nuo 620 iki 690 nm ilgio bangų ruožą. Atlikite tuščiąjį matavimą instrumentu (be plokštelės laikiklyje).

PLOVIMO PROCEDŪROS

Vietos atstovybėje galite gauti plovyklių, kurias rekomenduojama naudoti, ir plovyklių bei analizatorių tikrinimo procedūrų protokolus. Rekomenduojama naudoti šį protokolą:

a) Automatinės mikroplokštelių juostų plovyklės protokolas

Atlikite 5 plovimo ciklus, naudodami darbinio stiprumo plovimo skystį. Jeigu įmanoma, užtikrinkite, kad:

- i) Su DiaSorin tiekiamais instrumentais būtų naudojama 500 µL/šulinėliui užpildymo tūrio pratekančioji plovimo srovė. Jeigu naudojami kiti instrumentai, su kuriais tai neįmanoma, užtikrinkite, kad šulinėlis būtų visiškai užpildytas.
- ii) Įpylimo aukštis nustatytas taip, kad užpildytą visą šulinėlį su nedideliu teigiamu paviršiaus išsipūtimu, bet nebūtų perpildos.
- iii) Vienam įsiurbimo/plovimo/mirkymo ciklui atlikti reikia maždaug 30 sekundžių.
- iv) Užtikrinkite, kad šulinėlyje neliktų skysčio (jeigu galima, pabaigos cikle atlikite du įsiurbimo veiksmus).
- v) Baigus plovimą, apverskite plokštelę ir iškratykite plovimo skysčio likučius ant sugeriamojo popieriaus.

PASTABA. Tyrimo procedūros metu neleiskite šulinėliams išdžiūti.

Baigus tyrimą plovyklės reikia išskalauti distiliuotu vandeniu, kad neužsikimštų ir nevyktų korozija.

VISIŠKAI AUTOMATINIS MIKROPLOKŠTELIŲ PROCESORIUS

Išsamios informacijos apie šiuo metu esančius įvertinto tinkamumo protokolus, kreipkitės į vietos atstovybę. Jeigu naudojate instrumentus, neturinčius protokolų, kurių tinkamumas įvertintas, rekomenduojama laikytis šių nurodymų.

1. Nesuprogramuokite trukmės, mažesnės nei nurodyta procedūroje.
2. Kiekvienos inkubacijos 37°C temperatūroje trukmę galima suprogramuoti ne daugiau nei 20% ilgesnę.
3. Šulinėlius su mėginių skiedikliai prieš mėginio įpylimą galima laikyti ne ilgiau nei 60 minučių 18–30°C temperatūroje ir ne ilgiau nei 60 minučių po mėginių ir kontrolės medžiagų pridėjimo prieš pradėdant 5 veiksmą.
4. Užtikrinkite, kad būtų laikomasi visų **Analizės atsargumo priemonių**.

Prieš naudojimą pagal vietoje nustatytas procedūras reikia išsamiai įvertinti sudarytų protokolų tinkamumą pagal šias gaires.

REZULTATAI

REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS

Skaičiuojant ir interpretuojant tyrimo rezultatus kiekvieną plokštelę reikia analizuoti atskirai.

Rezultatus skaičiuoti ir interpretuoti reikia naudojant patvirtintą programinę įrangą.

Neigiama kontrolės medžiaga

Apskaičiuokite vidutinę neigiamos kontrolės medžiagos kartotinių absorbuojamąją gebą.

Jeigu bent vieno neigiamos kontrolės medžiagos šulinėlio absorbuojamoji geba daugiau nei 0,03 didesnė už kitą, didesniąją vertę atmeskite.

Kirpinio vertė

Apskaičiuokite kirpinio vertę, prie neigiamos kontrolės kartotinių reikšmių vidurkio pridėdami 0,05.

Neigiamos kontrolės medžiagos absorbuojamoji geba

1 šulinėlis = 0,071

2 šulinėlis = 0,075

Neigiamos kontrolės

medžiagos vidurkis = $(0,071 + 0,075)/2 = 0,073$

Kirpinio vertė = $0,073 + 0,05 = 0,123$

KOKYBĖS KONTROLĖ

Tyrimo rezultatai yra galiojantys, jeigu atitinka šiuos kontrolės kriterijus:

Neigiama kontrolės medžiaga

Neigiamos kontrolės medžiagos vidurkis $A_{450/ref}$ yra mažesnis nei 0,15 arba neigiamos kontrolės vertės vidurkis A_{450} yra mažesnis nei 0,2.

Teigiamos kontrolės medžiagos

Teigiamos kontrolės medžiagos $A_{450/ref}$ arba A_{450} vertė daugiau nei 0,8 didesnė nei neigiamos kontrolės medžiagos $A_{450/ref}$ arba A_{450} vertė.

Tyrimus, kurie neatitinka šių kriterijų, reikia pakartoti.

Retais atvejais, kai rezultatai pakartotinai neatitinka kokybės kontrolės kriterijų arba negaunamas laukiamas tyrimo atlikimo efektyvumas, prašome susisiekti su savo atstovu.

REZULTATŲ INTERPRETAVIMAS

Nereaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra mažesnė už kirpinio vertę, laikomi nereaguojančiais su „Murex HBsAg Version 3“.

Reaguojantys rezultatai

Mėginiai, kurių absorbuojamoji geba yra lygi kirpinio vertei arba didesnė už ją, laikomi pradiniai reagavusiais su tyrimu (žr. **Procedūros apribojimai**). Tokius mėginius reikia pakartotinai ištirti du kartus naudojant originalų mėginį. Mėginiai, kurie reagavo su bent vienu kartotiniu testu, laikytini turinčiais HBsAg; jų rezultatą reikia patvirtinti naudojant „Murex HBsAg Confirmatory Version 3“ rinkinį (2G27-01) ir atlikus kitų HBV žymenų testus. Mėginiai, kurie atlikus kartotinį tyrimą abiejuose šulinėliuose nereagavo, laikytini nereaguojančiais.

SPECIFINĖS TYRIMO FUNKCIONALUMO CHARAKTERISTIKOS

„Murex HBsAg Version 3“ tyrimo funkcionalumas buvo nustatytas ištyrus mėginius, paimtus iš atsitiktinių kraujo donorų, ūmine ir lėtine hepatito B infekcija sergančių pacientų, mutavusių formų hepatito B infekciją turinčių pacientų ir su hepatitu B nesusijusiomis ligomis sergančių pacientų.

Be to, jo atlikimo efektyvumas buvo vertinamas lyginant su Prancūzijos Medicininii preparatų saugos agentūros (pranc. AFSSAPS) paneliais ir rinkoje esančias serokonversijos mėginiais.

1. Diagnostinis savitumas

Studijoje, kurios metu keturiuose kraujo perpylimo centruose naudojant „Murex“ HBsAg tyrimą buvo atliktas iš viso 12330 rutininių kraujo donorų mėginių skringas, nustatytas $\geq 99,5\%$ „Murex HBsAg Version 3“ tyrimo specifiškumas. Šioje studijoje 0,18% (22/12330) mėginių buvo pirminiai reagavę, o 0,03% (4/12330) reagavo pakartotinai. Pakartotinai reagavusius su „Murex HBsAg Version 3“ ir alternatyviais tyrimais mėginius ištyrus dėl hepatito B paviršiaus antigeno buvimo, teigiamų rezultatų patvirtinta nebuvo.

Apskaičiuotasis „Murex HBsAg Version 3“ diagnostikos specifiškumas tikėtinai neigiamų donorų mėginių grupėje yra 99,97% (12326/12330), o binominio skirstinio 95% pasikliauties intervalas yra nuo 99,92% (12320/12330) iki 99,99% (12329/12330).

2. Analizinis savitumas

Kryžminis reaktivumas

Be to, naudojant „Murex HBsAg Version 3“ ištirti 798 potencialiai kryžmiškai reaguojantys mėginiai, paimti iš pacientų, turinčių su hepatito B infekcija nesusijusių sutrikimų, įskaitant kitas ūmines virusines infekcijas bei antenatalinius ir autoimuninius mėginius. Iš viso 796 mėginiai su „Murex HBsAg Version 3“ nereagavo. Vieno iš dviejų kartotinai reagavusių mėginių rezultatas buvo klaidingai reagavęs, o kitų hepatito žymenų jame nenustatyta, antrasis mėginys buvo anti-HBc atžvilgiu teigiamas.

3 lentelė

„Murex HBsAg Version 3“ veiksmingumas tiriant galinčius kryžmiškai reaguoti mėginius

Klinikinė kategorija	Iš viso
Ūminės virusinės infekcijos (hospitalizuoti pacientai)	233 (1)
Autoimuninė liga (hospitalizuoti pacientai)	108
Normali klinikinė būklė	27
Antenataliniai mėginiai	417 (1)
Reumatoidinio veiksnio atžvilgiu teigiami mėginiai	10
Nežinoma	3
Iš viso	798 (2)

(#) Rodo kryžminę reakciją

Šaiveika

Kontroliuojamas su „Murex HBsAg Version 3“ šaiveikauti galinčių medžiagų studijos šaiveikos neparodė, kai tirtų medžiagų koncentracija buvo, kaip nurodyta 4 lentelėje toliau.

4 lentelė

„Murex HBsAg Version 3“ veiksmingumas tiriant galinčius šaiveikauti mėginius

Medžiaga	Rezultatas
Netiesioginis bilirubinas	Šaiveikos nenustatyta esant 0,2 mg/mL
Trigliceridai	Šaiveikos nenustatyta esant 30 mg/mL
Heparinas	Šaiveikos nenustatyta esant 40 USP/mL
Cholesterolis	Šaiveikos nenustatyta esant 5 mg/mL
Bendrieji baltymai	Šaiveikos nenustatyta esant 40–120 mg/mL
Raudonieji kraujo kūneliai	Šaiveikos nenustatyta
Interferonas alfa 1	Šaiveikos nenustatyta esant 6000 IU/mL
Interferonas alfa 2a	Šaiveikos nenustatyta esant 6000 IU/mL
Interferonas alfa 2b	Šaiveikos nenustatyta esant 6000 IU/mL
Acetaminofenas	Šaiveikos nenustatyta esant 207 mg/L
Ibuprofenas	Šaiveikos nenustatyta esant 512 mg/L
Adefoviras dipivoksilis	Šaiveikos nenustatyta esant 10 mg/L
Telbivudinas	Šaiveikos nenustatyta esant 600 mg/L
Lamivudinas	Šaiveikos nenustatyta esant 1,05 mg/dL
Entekaviras	Šaiveikos nenustatyta esant 0,5 mg/L

Svarbi pastaba* 100 mg/dL = 1 mg/mL

3. Diagnostinis jautris

Trijose regioninėse referencinėse virusų tyrimo laboratorijose ir bendrovėje DiaSorin buvo ištirti įvairių stadijų hepatito B infekcija sergančių pacientų ir su hepatitu B nesusijusių sutrikimų turinčių pacientų mėginiai.

Naudojant „Murex HBsAg Version 3“ ištirti iš viso 584 mėginiai, paimti iš pacientų, sergančių ūmine arba lėtine hepatito B infekcija. Visų 584 mėginių rezultatai patvirtinti alternatyviu HBsAg imuniniu tyrimu ir teigiamas rezultatas nustatytas abiem tyrimais.

Naudojant „Murex HBsAg Version 3“ ir tris lyginamuosius CE ženklų pažymėtus tyrimus, skirtus HBsAg antigenų struktūros aptikimo tinkamumui nustatyti, ištirta dešimties (10) rekombinacinių mutantų plokštė. Mutantai apėmė svarbius epitopų telkinius aminorūgštyse nuo 100 iki 160, kuriuose buvo determinuojanti sritis (aminorūgštys 124–147) – svarbiausią serologinės diagnostikos taikinį. Naudojant „Murex HBsAg“ atpažinti aštuoni iš dešimties rekombinacinių mutantų; šis rezultatas panašus į nustatytą lyginamaisiais tyrimais arba geresnis.

5 lentelė

„Murex HBsAg Version 3“ veiksmingumas tiriant rekombinacinius mutantus

Mėginio ID	Mutacija	Lyginamasis HBsAg tyrimas ¹²			„Murex“, duomenys iš 1 plakato ¹²
		1	2	3	
01 mutantas	T123N	+	+	+	+
02 mutantas	T123N-T124S	-	-	-	-
03 mutantas	P142L-F/Y143H-D144E-G145R	+	-	-	-
04 mutantas	I110R-SS117I-G119R-T123N	+	+	-	+
05 mutantas	I22+DT	+	+	-	+
06 mutantas	I22+DT-G145R	+	+	-	+
07 mutantas	G145R	+	+	+	+
08 mutantas	D114A	+	+	+	+
09 mutantas	P142L-G145R	+	+	+	+
10 mutantas	P142S-G145R	+	+	+	+

Pastaba. „+“ ir „-“ atitinkamai reiškia reagavusius ir nereagavusius tyrimus

Dar penki pacientų, užsikrėtusių mutavusios formos hepatito B infekcija, patvirtinta atlikus DNR sekoskaitą, mėginiai taip pat ištirti naudojant „Murex HBsAg version 3“ ir visi rezultatai nustatyti teisingai.

Papildomai su „Murex HBsAg Version 3“ ištirtos iš viso 33 rinkoje esančios HBV serokonversijos plokštės. Palyginus su keturiais kitais rinkoje esančiais mikroplokštelių imuniniais tyrimais, skirtais hepatito B paviršiaus antigenui aptikti, nustatyta, kad naudojant „Murex HBsAg Version 3“ HBsAg aptinkamas panašiai, kaip naudojant kitus lyginamuosius rinkoje esančius imuninius tyrimus.

4. Analizinis jautris

„Murex HBsAg Version 3“ išbandytas su PSO trečiojo tarptautinio standarto HBsAg (HBV genotipas B4, potipiai ayw1/adw2), NIBSC kodas 12/226) ir nustatyta, kad analizė aptinkama iki 0,023 TV/mL ribos.

5. Tyrimo atkartojamumas ir atkuriamumas

Siekiant patvirtinti „Murex HBsAg Version 3“ atkuriamumą, kiekvienas iš penkių mėginių buvo ištirtas atlikus dešimt kartotinių dešimčiai atskirų atvejų, naudojant dvejų skirtingų partijų reagentus. Tyrimo rezultaty suvestinė pateikiama 6 lentelėje ir 7 lentelėje.

6 lentelė

„Murex HBsAg Version 3“ – tyrimo atkartojamumas ir atkuriamumas (1 rinkinys)

Bandinys	Tyrimų skaičius	Vidurkis S/CO	Atliekant vieną tyrimą, VK (%)	Atliekant kelis tyrimus, VK (%)
1	10	9,26	7,6	10,0
2	10	3,56	8,2	10,8
3	10	12,28	10,0	13,1
4	10	1,88	9,3	12,4
5	10	0,69	11,0	14,2

7 lentelė
„Murex HBsAg Version 3“ – tyrimo atkartojamumas ir atkuriamumas (2 rinkinys)

Bandinys	Tyrimų skaičius	Vidurkis S/CO	Atliekant vieną tyrimą, VK (%)	Atliekant kelis tyrimus, VK (%)
1	10	10,46	6,8	8,1
2	10	3,89	7,2	9,2
3	10	12,22	7,7	9,5
4	10	1,80	9,3	13,1
5	10	0,58	7,4	7,9

Pateikiami tipiniai funkcionalumo duomenys: skirtingose laboratorijose gaunami kitų gyventojų grupių rezultatai gali skirtis.

PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

- Būtina laikytis skyriuose **Tyrimo procedūra ir Rezultatų interpretavimas** pateiktą nuorodą.
- Tyrimas buvo įvertintas tik naudojant atskirų individų (ne jungtinio) serumo, plazmos su EDTA arba plazmos su citratu mėginius.
- Neigiami antigeno nustatymo tyrimo rezultatai neatmeta infekcijos galimybės.
- Teigiamus rezultatus, kurių neįmanoma pakartoti, galima gauti atliekant bet kurią EIA procedūrą.
- Dažniausi klaidų šaltiniai yra:
 - Netikslus mėginio, konjugato arba substrato įpylimas į šulinėlius.
 - Substrato užteršimas konjugatu.
 - Užteršimas konjugatais iš kitų tyrimų.
 - Užsikimšę arba iš dalies užsikimšę plovyklės zondai.
 - Nepakankamas įsiurbimas, dėl ko šulinėliuose liko nedidelis kiekis plovimo skysčio.
 - Prieš plokštelės nuskaitymą nepatikrinus, ar šulinėlių dugnas yra švarus bei sausas ir ar šulinėliuose esančio skysčio paviršiuje nėra burbuliukų.
 - Nepavykęs nuskaitymas tinkamo ilgio bangose arba netinkamo ilgio referencinių bangų naudojimas.
- Naudojant stipriai hemolizuotus mėginius, mėginius su žmogaus antikūnais prieš pelių antigenus, ne visiškai sukrešėjusius serumus, plazmos mėginius su fibrinu arba mikrobiologiškai užterštus mėginius gali padaugėti klaidingų rezultatų.
- Šis tyrimas nebuvo įvertintas dėl galimybės naudoti tiriant lavonų mėginius.

Saugos ir veiksmingumo savybių santrauką galima gauti EUDAMED.

Tik ES: atkreipkite dėmesį, kad apie visus sunkius su šia IVD medicinos priemone susijusius incidentus reikia pranešti „DiaSorin Italia S.p.A.“ atstovybei JK ir ES valstybės narės, kurioje įsisteigęs naudotojas ir (arba) gyvena pacientas, kompetentingajai tarnybai.

LITERATŪRA

- EASL. Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. s.l.: **European Association for the Study of the Liver**. Electronic address, e.e.e.& European Association for the Study of the Liver, L. EASL, 2017. J Hepatol 67, 370-398. (2017).
- Advances in the molecular diagnosis of hepatitis B infection: providing insight into the next generation of disease. **Bayliss, J. Nguyen, T., Lesmana, C.R., Bowden, S. & Revill, P.** 113-121, 2013, Vol. Semin Liver Dis. 33.
- Management of chronic hepatitis B: Canadian Association for the Study of the Liver consensus guidelines. **Coffin, C.S., Fung, S.K. & Ma, M.M.** 917-938, s.l.: Can J. Gastroenterol, 2012, Vol. 26.
- KASL, Clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B. (**KASL**), **Korea Association of the Study of the Liver**. 18-75, s.l.: Clin Mol Hepatol, 2016, Vol. 22.
- Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. **Organization, World Health**. s.l.: WHO, 2015.
- Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. **Sarin, S.K. et al.** 1-98, s.l.: Hepatol. Int., 2016, Vol. 10.
- SASLT practice guidelines for the management of hepatitis B virus. **Abalkhail, F. et al.** 5-25, s.l.: Saudi J Gastroenterol, 2014, Vol. 20.
- Updated CDC recommendations for the management of hepatitis B virus-infected health-care providers and students. (CDC), **Centers for Disease Control and Prevention**. 1-12, s.l.: MMWR Recomm Rep, 2012, Vol. 61.
- South African guideline for the management of chronic hepatitis B. **Spearman, C.W. et al.** 337-349, s.l.: S Afr Med J, 2013, Vol. 103.
- Centres for disease Control**. (1985). recommendations for preventing transmission of infection with human T-lymphotropic virus type III / lymphadenopathy-associated virus in the workplace. MMWR, 34, No. 45, 681.
- Fung, J. et al.** (2011). Stability of hepatitis B surface antigen over time: Implications for studies using stored sera. Journal of Medical Virology, 83(11), 1900–1904.
- Sarasso C. et al. A Novel Panel of Recombinant Hepatitis B Surface Antigens Mutants. Source: https://www.diasorin.com/sites/default/files/rd/publications/attachments/poster_Isn_xl_hbsag_q_escv_2_010_sarasso.pdf.

Bronidox® ir ProClin® nėra bendrovės DiaSorin prekių ženklai.



DiaSorin Italia S.p.A. UK Branch
Central Road,
Dartford DA1 5LR
UK



0123

EC REP DiaSorin Italia S.p.A.
via Crescentino snc
13040 Saluggia (VC) - Italy

F01DS34LT
2024 m. vasario mėn.

HBc IgM

„Sugavimo“ fermento imunologinis
tyrimas (ELISA)
kiekybiniam/kokybiniam
IgM klasės antikūnų nustatymui prieš
Hepatito B viruso branduolio antigeną
žmogaus plazmoje ir serume

- tik “in vitro” diagnostikai -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF BCM.CE
96 Testai

HbC IgM

A. PASKIRTIS

Fermentinis imuninis tyrimas (ELISA), skirtas kiekybiniam/kokybiniam IgM klasės antikūnų prieš hepatito B viruso branduolio antigeną žmogaus plazmoje ir serume nustatymui naudojant „sugavimo“ sistemą. Rinkinytis skirtas viruso sukėlėjui klasifikuoti ir lėtinių pacientų, kuriems taikomas gydymas, stebėjimui. Tik „in vitro“ diagnostikai.

B. ĮVADAS

Hepatito B branduolio antigenas (arba HBcAg) yra pagrindinis hepatito B viruso (arba HBV) pagrindinių dalelių komponentas. Dalelių dydis yra 27 nm, juose yra dvigrandė DNR molekulė, specifinė DNR polimerazė ir HBcAg. HBcAg susideda iš vieno maždaug 17 kD polipeptido, kuris paleidžiamas vykstant dezegregacijai branduolio dalelių; antigene yra bent vienas imunologinis determinantas.

Pirminės infekcijos atveju anti HBcAg IgM antikūnai yra vienas iš pirmųjų HBV hepatito žymenų, atsirandančių paciento serume kartu arba šiek tiek vėliau nei HBsAg, viruso paviršiaus antigenas. Anti HBcAg IgM titrai, labai aukšti ūminės fazės metu, ligos eigoje mažėja, kai atsiranda IgG antikūnų, iki neaptinkamo lygio sveikstantiems pacientams.

Tačiau sergant lėtiniu hepatitu, yra pastebimi anti-HBcAg IgM sintezės šuoliai, patvirtinantys HBV reaktyvumą hepatocituose ir palaikantys nuolatinį žemą IgM titrą.

Anti HBcAg IgM antikūnų nustatymas tapo labai svarbus greitam viruso klasifikavimui, ligos fazei ir pacientų, gydomų interferonu, stebėjimui.

C. BANDYMO PRINCIPAS

Tyrimas pagrįstas „IgM gaudymo“ principu, kai IgM klasės antikūnai mėginyje pirmiausia „sugaunami“ kietosios fazės, padengtos anti-IgM antikūnu.

Nuplovus visus kitus mėginio komponentus, ypač IgG antikūnus, specifinis IgM, prisirišęs ant kietos fazės, aptinkamas pridendant išgrynintą rekombinantinio HBcAg preparatą, paženklinatą monokloniniu antikūnu, konjuguotu su peroksidaze (HRP).

Po inkubacijos mikrošulinėliai išplaunami, kad būtų pašalintas neprisijungęs konjugatas, o tada pridamas chromogenas/substratas.

Esant peroksidazei, bespalvis substratas hidrolizuojamas iki spalvoto galutinio produkto, kurio optinis tankis gali būti aptiktas ir yra proporcingas mėginyje esančių IgM antikūnų prieš HBcAg kiekiui.

D. KOMPONENTAI

Kiekviename rinkinyje yra pakankamai reagentų 96 tyrimams atlikti.

1. Mikroplokštelė: MICROPLATE

8x12 mikrošulinėlių juostelės, padengtos išgrynintu anti-žmogaus IgM specifiniu pelės monokloniniu antikūnu, vėliau padengtos galvijų serumo baltymais ir laikytos maišelyje su sausikliu. Prieš atidarydami leiskite mikroplokštei sušilti iki kambario temperatūros; nepanaudotas juosteles vėl uždarykite maišelyje su sausikliu ir laikykite 4°C temperatūroje.

2. Kalibracinė kreivė: CAL N° ...

6x2,0 ml/buteliukas. Paruošta naudojimui ir spalvomis pažymėta standartinė kreivė, kalibruota naudojant HBcIgM etaloninį preparatą, kurį pateikė Paul Erlich institutas (HBc-Referenzserum-IgM 84), diapazonas: CAL1 = 0 U/ml // CAL2 = 5 U/ml // CAL3 = 10 U/ml // CAL4 = 20 U/ml // CAL 5 = 50 U/ml // CAL 6 = 100 U/ml.

Jame yra chemiškai inaktyvuotos HBcIgM teigiamos žmogaus plazmos, 100 mM Tris buferio pH 7,4+/-0,1, 0,5 % Tween 20, 0,09 % natrio azido ir 0,045 % ProClin 300, kurie naudojami kaip konservantai.

Kalibravimo kreivė užkoduota mėlynais maistiniais dažais.

Svarbi pastaba: Net jei plazma buvo chemiškai inaktyvuota, laikykite šį komponentą kaip potencialiai užkrečiamą

3. Plovimo buferio koncentratas: WASHBUF 20X

1x60ml/buteliukas. 20x koncentruotas tirpalas.

Praskiestame tirpale yra 10 mM fosfato buferio pH 7,0+/-0,2, 0,05 % Tween 20 ir 0,045 % ProClin 300.

4. Fermento konjugatas (imunokompleksas): CONJ

1x16,0 ml/buteliukas. Paruoštas naudojimui sprendimas. Sudėtyje yra imunokompleksas, sudarytas iš specifinio pelės monokloninio antikūno, pažymėto HRP, ir išgryninto rekombinantinio HBcAg.

Reagentas ištirpinamas buferiniame tirpale 10 mM Tris buferio pH 6,8+/-0,1, 2% BSA, 0,045% ProClin 300 ir 0,02% gentamicino sulfatu, kurie naudojami kaip konservantai. Komponentas pažymėtas raudona spalva.

5. Mėginio skiediklis: DILSPE

2x60,0 ml/buteliukas. Buferinis tirpalas mėginiams skiesti; jame yra 100 mM Tris buferio pH 7,4+/-0,1, 0,5 % Tween 20, 2 % Kazeinas, 0,045 % ProClin 300 ir 0,09 % natrio azido, kurie naudojami kaip konservantai. Komponentas pažymėtas mėlyna spalva.

6. Kontrolinis serumas: CONTROL ...m

1 buteliukas. Liofilizuotas. Sudėtyje yra galvijų vaisiaus serumo, žmogaus HBcIgM teigiamos žmogaus plazmos, kalibruotos 20 ± 10 % PEI U/ml. 0,2 mg/ml gentamicino sulfato ir 0,045 % ProClin 300, kurie naudojami kaip konservantai.

Svarbi pastaba:

1. Buteliuko turiniui ištirpinti reikalingas tūris gali skirtis priklausomai nuo partijos. Naudokite tinkamą tūrį, nurodytą etiketėje.

2. Svarbi pastaba: Net jei plazma buvo chemiškai inaktyvuota, laikykite šį komponentą kaip potencialiai užkrečiamą.

7. Chromogenas/Substratas: SUBS TMB

1x16ml/vial. 1x16ml/buteliukas. Sudėtyje yra 50 mM citrato-fosfato buferinio tirpalo, kurio pH 3,5–3,8, 4 % dimetilsulfoksido, 0,03 % tetrametilbenzidino arba TMB ir 0,02 % vandenilio peroksido arba H₂O₂.

Pastaba: saugoti nuo šviesos, nes jautrus stipriam apšvietimui.

8. Sieros rūgštis: H2SO4 0.3 M

11x15ml/buteliukas. Sudėtyje yra 0,3 M H₂SO₄ tirpalo.

Dėmesio: dirginantis (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

9. Ploštelės sandarinimo folija: n° 2

10. Pakuotės instrukcija: n° 1

E. REIKALINGOS, BET NEPATEIKTOS MEDŽIAGOS

1. Kalibruotos mikropipetės (150 ul, 100 ul ir 50 ul) ir vienkartiniai plastikiniai antgaliai.

2. EIA klasės vanduo (dvigubai distiliuotas arba dejonizuotas, apdorotas anglimi, kad būtų pašalintos oksiduojančios cheminės medžiagos, naudojamos kaip dezinfekavimo priemonės).

3. Laikmatis su 60 minučių ar didesniu diapazonu.

4. Sugeriančios popierinės servetėlės.

5. Kalibruotas ELISA mikroplokštelės termostatinis inkubatorius (sausas arba šlapias), nustatytas +37°C.

6. Kalibruotas ELISA mikrošulinėlių skaitytuvas su 450 nm (skaitymas) ir su 620-630 nm (tuščiu) filtrais.

7. Kalibruotas ELISA mikroplokštelių plovimo įrenginys.

8. Vorteksas arba panašūs maišymo įrankiai.

F. ĮSPĖJIMAI IR ATSARGUMO PRIEMONĖS

1. Rinkinį gali naudoti tik kvalifikuotas ir tinkamai apmokytas techninis personalas, prižiūrimas už laboratoriją atsakingo gydytojo.
2. Visi tyrimo atlikime dalyvaujantys darbuotojai turi dėvėti apsauginius laboratorinius drabužius, pirštines be talko ir akinius. Reikėtų vengti naudoti bet kokius aštirus (adatos) ar pjovimo (ašmenys) įtaisus. Visas dalyvaujantis personalas turėtų būti apmokytas vadovautis biologinės saugos procedūromis, kaip rekomenduoja Ligų kontrolės centras, Atlanta, JAV ir apie tai pranešta Nacionalinio sveikatos instituto leidinyje „Biologinė sauga mikrobiologinėse ir biomedicininėse laboratorijose“, red. 1984 m.
3. Visi darbuotojai, dirbantys su mėginių tvarkymu, turėtų būti paskiepyti nuo HBV ir HAV saugiomis ir veiksmingomis vakcinomis.
4. Laboratorijos aplinka turi būti kontroliuojama taip, kad atidarant rinkinio buteliukus ir mikroplokštes bei atliekant tyrimą būtų išvengta kontaminantų, tokių kaip dulkelės arba oru plintančios mikrobiologinės medžiagos. Saugokite chromogeną / substratą (TMB) nuo stiprios šviesos ir venkite paviršiaus, kuriame atliekamas bandymas, vibracijos.
5. Gavęs rinkinį laikykite 2–8°C temperatūroje šaldytuve arba šaltoje patalpoje, kurioje yra kontroliuojama temperatūra.
6. Nekeiskite komponentų tarp skirtingų rinkinių partijų. Rekomenduojama, kad dviejų tos pačios partijos rinkinių komponentai nebūtų keičiami.
7. Patikrinkite, ar reagentai yra skaidrūs ir ar juose nėra matomų sunkiųjų dalelių ar agregatų. Jei ne, patarkite laboratorijos vadovui pradėti reikiamas procedūras.
8. Venkite kryžminio serumo/plazmos mėginių užteršimo naudodami vienkartinius antgalius ir keisdami juos po kiekvieno mėginio. Nenaudokite vienkartinį antgalių pakartotinai.
9. Venkite kryžminio užteršimo tarp rinkinio reagentų naudodami vienkartinį antgalių ir keisdami juos tarp kiekvieno naudojimo. Nenaudokite vienkartinį antgalių pakartotinai.
10. Nenaudokite rinkinio pasibaigus galiojimo laikui, nurodytam ant išorinės (pirminės dėžutės) ir vidinės (buteliukų) etiketės.
11. Apdorokite visus mėginius kaip potencialiai užkrečiamus. Visi žmogaus serumo mėginiai turi būti tvarkomi 2 biologinės saugos lygiu, kaip rekomendavo Ligų kontrolės centras, Atlanta, JAV, vadovaujantis tuo, kas buvo paskelbta Sveikatos instituto leidinyje: „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“, red. 1984 m.
12. Norint išvengti užteršimo, ruošiant plovimo tirpalą arba perkelti komponentus į kitus darbo vietų konteinerius, rekomenduojama naudoti vienkartinį plastikinius indus.
13. Atliekos, susidariusios naudojant rinkinį, turi būti išmestos laikantis nacionalinių direktyvų ir įstatymų dėl cheminių ir biologinių medžiagų laboratorinių atliekų. Visų pirma, skystos atliekos, susidarancios po plovimo, iš kontrolinių mėginių likučių ir mėginių, turi būti traktuojamos kaip potencialiai užkrečiamos medžiagos ir turi būti inaktyvuotos. Siūlomos inaktyvavimo procedūros yra apdorojimas 10% galutinės koncentracijos buitiniu balikliu, 16-18 valandų arba terminis inaktyvavimas autoklave 121°C temperatūroje 20 min.
14. Atsitiktinai išsiliejusias medžiagas reikia adsorbuoti buitiniu balikliu suvilgytu popieriniu rankšluosčiu, o po to vandeniui. Tada audinius reikia išmesti į tinkamus konteinerius, skirtus laboratorinėms/ligoninėms atliekoms.
15. Stop tirpalas yra dirginantis. Išsiliejus paviršių nuplauti dideliu kiekiu vandens
16. Kitos atliekos, susidariusios naudojant rinkinį (pavyzdys: antgaliai, naudojami mėginiams ir kontrolėms, panaudotos mikroplokštelės), turi būti tvarkomos kaip potencialiai užkrečiamos ir sunaikinamos pagal nacionalines direktyvas ir įstatymus dėl laboratorinių atliekų.

G. MĖGINYS: PARUOŠIMAS IR REKOMENDACIJOS

1. Kraujas paimamas aseptiškai, atliekant venopunktūrą, o plazma arba serumas paruošiamas naudojant standartinius mėginių paruošimo klinicinei laboratorinei analizei metodus. Nebuvo pastebėta jokio įtakos paruošiant mėginį su citratu, EDTA ir heparinu.

2. Venkite bet kokių konservantų pridėjimo; ypač natrio azidas, nes ši cheminė medžiaga paveiktų konjugato fermentinį aktyvumą ir sukeltų klaidingai neigiamus rezultatus.
3. Mėginiai turi būti aiškiai pažymėti kodais arba pavadinimais, kad būtų išvengta klaidingo rezultatų interpretavimo.
4. Hemolizuotus ir akivaizdžiai hiperlipeminius mėginius reikia išmesti, nes jie gali sukelti klaidingus rezultatus. Mėginius, kuriuose yra fibrino likučių arba sunkiųjų dalelių arba mikrobu gijų ir kūnelių, reikia išmesti, nes jie gali duoti klaidingus rezultatus.
5. Serumą ir plazmą galima laikyti +2°...+8°C temperatūroje pirminiuose surinkimo mėgintuvėliuose iki penkių dienų po surinkimo. Neužšaldykite pirminių surinkimo mėgintuvėlių. Laikant ilgesnį laiką, serumo ir plazmos mėginiai, atsargiai išimti iš pirminio paėmimo mėgintuvėlio, gali būti laikomi užšaldyti –20°C temperatūroje mažiausiai 12 mėnesių. Bet kokių užšaldytų mėginių negalima užšaldyti / atšildyti daugiau nei vieną kartą, nes gali susidaryti dalelių, kurios gali turėti įtakos tyrimo rezultatui.
6. Jei yra dalelių, centrifuguokite 2000 aps./min. greičiu arba filtruokite naudodami 0,2–0,8 µm filtrus, kad išvalitytume mėginį tyrimui..

H. KOMPONENTŲ PARUOŠIMAS IR ĮSPĖJIMAI

Tyrimas, atliktas su atidarytu rinkiniu, neparodė jokio reikšmingo aktyvumo praradimo iki 6 pakartotinio prietaiso naudojimo ir iki 3 mėnesių.

Mikroplokštelė:

Prieš atidarydami pakuotę, leiskite mikroplokštei pasiekti kambario temperatūrą (apie 1 val.). Patikrinkite, ar sausiklis nepasidarė tamsiai žalias, o tai rodo gamybos defektą. Tokiu atveju paskambinkite Dia.Pro klientų aptarnavimo tarnybai. Nepanaudotas juosteles reikia įdėti atgal į aliuminio maišelį su pridėdamu sausikliu, tvirtai užsegti užtrauktuku ir laikyti +2°-8°C temperatūroje. Pirmą kartą atidarius nepanaudotas juostelės išlieka stabilios, kol drėgmės indikatorius sausiklio maišelio viduje pasidaro iš geltonos į žalią.

Kalibracinė kreivė:

Paruoštas naudoti.

Plovimo buferio koncentratas:

Visą 20 kartų koncentruoto tirpalo turinį reikia atskiesti bidistiliuotu vandeniu iki 1200 ml ir prieš naudojimą švelniai išmaišyti. Ruošdami venkite putojimo, nes burbuliukai gali turėti įtakos plovimo ciklų efektyvumui.

Note Pastaba: praskiestas plovimo tirpalas išlieka stabilus 1 savaitę +2...8°C.

Fermentų konjugatas:

Paruoštas naudoti. Prieš naudojimą gerai išmaišykite ant vortekso. Venkite skysčio užteršimo oksiduojančiomis cheminėmis medžiagomis, dulkėmis ar mikrobais. Jei šį komponentą reikia perkelti, naudokite tik plastikinius ir, jei įmanoma, sterilius vienkartinius indus.

Mėginio skiediklis:

Paruoštas naudoti. Išmaišykite prieš naudojimą.

Kontrolinis serumas:

Buteliuko turinį ištrpinkite EIA klasės vandeniui, kaip nurodyta etiketėje. Prieš naudojimą gerai išmaišykite ant vortekso. Ištrpinkite kontrolinis serumas yra paruoštas naudoti.

Pastaba: kontrolė po ištrpinimo nėra stabili. Laikyti užšaldytą alikvotinėmis dalimis –20°C temperatūroje.

Chromogenas/substratas:

Paruoštas naudoti. Išmaišykite prieš naudojimą.

Venkite skysčio užteršimo oksiduojančiomis cheminėmis medžiagomis, oro varomomis dulkėmis ar mikrobais. Nelaiykite ant intensyvios šviesos, oksiduojančių medžiagų ir metalinių paviršių.

Jei šį komponentą reikia perkelti, naudokite tik plastikinį ir, jei įmanoma, sterilų vienkartinį indą.

Sieros rūgštis:

Paruoštas naudoti. Prieš naudojimą gerai išmaišykite ant sūkurio. Dėmesio: dirginantis (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Įspėjamieji H teiginiai:

H315 – Dirgina odą.

H319 – Stipriai dirgina akis.

Atsargumo P teiginiai:

P280 – Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/dėvėti akių/veido apsaugos priemones.

P302 + P352 – PATEKUS ANT ODOS: nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens.

P332 + P313 – Jei sudirginama oda: kreiptis į gydytoją.

P305 + P351 + P338 – PATEKUS Į AKIS: keletą minučių atsargiai plauti vandeniu. Išsiimkite kontaktinius lęšius, jei yra ir tai lengva padaryti. Tęsti skalavimą.

P337 + P313 – Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją.

P362 + P363 – Nusivilkti užterštus drabužius ir prieš pakartotinį naudojimą juos išskalbti.

I. DERINIAI IR PRIEMONĖS, NAUDOJAMOS SU RINKINIU

1. Mikropipetės turi būti sukalibruotos, kad išpilstytų reikiamą tūrį, reikalingą tyrimui, ir reguliariai nukenksminamos (buitinis alkoholis, 10 % baliklio tirpalas, lignoninių dezinfekavimo priemonės) tos dalys, kurios gali atsitiktinai liestis su mėginiu. Jos taip pat turėtų būti reguliariai prižiūrimos. Taip pat reikia reguliariai nukenksminti išsipyčiusias arba rinkinio komponentų likučius. Mikropipetės taip pat turėtų būti reguliariai prižiūrimos, kad būtų išgaunamas 1% preciziškumas ir $\pm 2\%$ teisingumas.

2. ELISA inkubatorius turi būti nustatytas $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje (leistinas nuokrypis $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) ir reguliariai tikrinamas, kad būtų palaikoma tinkama temperatūra. Inkubavimui tinka ir sausieji inkubatoriai, ir vandens vonios, jei instrumentas yra patvirtintas ELISA tyrimams inkubuoti.

3. ELISA plokštelės plovimo įrenginys yra labai svarbus bendram tyrimo veikimui. Įrenginys turi būti iš anksto kruopščiai patikrintas, ar tiekiamas tinkamas dozavimo tūris, ir reguliariai atliekama techninė priežiūra pagal gamintojo naudojimo instrukcijas. Visų pirma, įrenginys, pasibaigus kasdienio darbo krūviui, turi būti kruopščiai išvalytas nuo druskų dejonizuotu vandeniu. Prieš naudojimą įrenginys turi būti praleidžiamas su atskiestu plovimo tirpalu.

Prietaisas turi būti kas savaitę nukenksminamas pagal jo vadovą (siūlomas dekontaminavimas NaOH 0,1 M).

5 plovimo ciklų (siurbimas + 350 ul plovimo tirpalo išleidimas į duobutę + 20 sekundžių mirkymas = 1 ciklas) pakanka, kad būtų užtikrintas deklaruotas procedūros atlikimas. Jei mirkyti neįmanoma, pridėkite dar vieną plovimo ciklą.

Neteisingas plovimo ciklas arba druskos užkimštos adatos yra pagrindinė klaidingai teigiamų reakcijų priežastis.

4. Inkubavimo laiko nuokrypis yra $+5\%$.

5. ELISA skaitytuve turi būti 450 nm skaitymo filtras ir antrasis 620–630 nm filtras, blynko tikslais. Balno procedūra atliekama pirmajame šulinyje, nurodytame skyriuje „Tyrimo procedūra“.

Optinė skaitytuvo sistema turi būti reguliariai kalibruojama, kad būtų išmatuotas teisingas optinis tankis. Jis turi būti reguliariai prižiūrimas pagal gamintojo instrukcijas.

6. Naudojant ELISA automatizuotą darbo vietą, visi svarbūs žingsniai (išpilstymas, inkubavimas, plovimas, nuskaitymas, duomenų analizavimas) turi būti kruopščiai nustatyti, sukalibruoti, kontroliuojami, turi būti reguliariai atliekami techninės priežiūros darbai, kad atitiktų reikšmes, nurodytas skyriuose „Validuotas tyrimas“ ir „Tyrimo rezultatai“. Tyrimo protokolais turi būti įdiegtas įrenginio operacinėje sistemoje ir patvirtintas kaip ir plokštelės plovimo įrenginys bei skaitytuvai. Be to, stoties skysčių tvarkymo dalis (išpylimas ir plovimas) turi būti patvirtinta ir tinkamai nustatyta. Ypatinę dėmesį reikia skirti tam, kad adatų atliekamam dozavimui ir plovimui. Tai turi būti iširta ir kontroliuojama, kad būtų sumažinta gretimų šulinėlių užteršimo galimybė. ELISA automatizuotas darbo vietas rekomenduojama naudoti, kai tiriamų mėginių skaičius viršija 20-30 vienetų per vieną paleidimą.

7. Dia.Pro klientų aptarnavimo tarnyba siūlo vartotojui pagalbą nustatant ir tikrinant kartu su rinkiniu naudojamus instrumentus, kad būtų užtikrinta atitiktis aprašytiems reikalavimams. Taip pat teikiama parama montuojant naujus instrumentus, kurie bus naudojami kartu su rinkiniu.

L. IŠANKSTINĖS TYRIMO KONTROLĖS IR OPERACIJOS

1. Patikrinkite rinkinio galiojimo datą, atspausdintą ant išorinės etiketės (pirminė pakuotė). Nenaudokite, jei pasibaigė galiojimo laikas.
 2. Patikrinkite, ar skystos sudedamosios dalys nėra užterštos matomomis dalelėmis ar agregatais. Patikrinkite, ar chromogenas/substratas (TMB+H₂O₂) yra bespalvis arba švelniai mėlynas, nedidelį jo tūrį išsiurbdami sterilia plastikine pipete. Patikrinkite, ar transportuojant nebuvo lūžių ir ar dėžutės (pirminės pakuotės) viduje neišsiliejo skystis. Patikrinkite, ar aliuminio maišelis, kuriame yra mikroplokštelė, nėra pradurtas ar pažeistas.
 3. Praskieskite visą 20 kartų koncentruoto plovimo tirpalo turinį, kaip aprašyta aukščiau.
 4. Ištirpinkite kontrolinį serumą, kaip aprašyta aukščiau, ir švelniai išmaišykite.
 5. Leiskite visiems kitiems komponentams sušilti iki kambario temperatūros (apie 1 val.), tada švelniai sumaišykite visus skystus reagentus.
 6. Nustatykite ELISA inkubatorių $+37^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir paruoškite ELISA mikroplokštelės plovimo įrenginį užpildydami praskiestu plovimo tirpalu pagal gamintojo instrukcijas. Nustatykite tinkamą plovimo ciklų skaičių, kaip nurodyta konkrečiame skyriuje.
 7. Patikrinkite, ar ELISA skaitytuvai įjungtas, arba įsitikinkite, kad jis bus įjungtas bent 20 minučių prieš skaitymą.
 8. Jei naudojate automatizuotą darbo vietą, įjunkite, patikrinkite nustatymus ir būtinai naudokite tinkamą tyrimo protokolą.
 9. Patikrinkite, ar mikropipetės nustatytas paaimti reikiamą tūrį.
 10. Patikrinkite, ar visa kita įranga yra prieinama ir paruošta naudoti.
- Iškilus problemoms, testo nebetęskite ir kreipkitės į vadovą.***

M. TYRIMO TVARKA

Tyrimas turi būti atliktas pagal tai, kas nurodyta toliau, stengiantis, kad būtų išlaikytas vienodas visų tiriamų mėginių inkubacijos laikas.

Gydytojo pageidavimu aparatu galima atlikti dvi procedūras.

M.1 Kiekybinė analizė

1. Į plastikinį laikiklį įdėkite reikiamą juostelių skaičių ir atsargiai nustatykite standartų ir mėginių duobutes.

2. Atskieskite mėginius santykiu 1:101, į vienkartinį mėgintuvėlį išpilstydami 1 ml mėginio skiediklio ir tada 10 ul mėginio; prieš naudojimą sumaišykite ant vortekso. Neskieskite kalibratorių ir ištirpusio kontrolinio serumo, nes jie yra paruošti naudoti.

3. Palikite A1+B1 šulinėlius tuščius, kad juos būtų galima uždaryti.

4. Dubliais įpilkite 100 μl kalibratorių, 100 μl ištirpusio kontrolinio serumo dubliais, po to 100 μl praskiestų mėginių. Kontrolinis serumas turi būti naudojamas patikrinti, ar visa analitinė sistema veikia taip, kaip tikėtasi. Patikrinkite, ar teisingai supilti kalibratoriai, kontrolinis serumas ir mėginiai.

5. Mikroplokštelę inkubuokite **60 min +37°C temperatūroje**.

Svarbi pastaba: Juostelės turi būti sandarinamos lipnia sandarinimo folija, tik tada, kai bandymas atliekamas rankiniu būdu. Neuždenkite juostelių, kai naudojate ELISA automatinius instrumentus.

6. Baigę pirmąjį inkubavimą, išplaukite šulinėlius, kaip aprašyta anksčiau (l.3 skirsnis).

7. Į visus šulinius, išskyrus A1+B1, pipete įpilkite 100 μl fermento konjugato. Mikroplokštelę inkubuokite 60 min +37°C temperatūroje.

Svarbi pastaba: būkite atsargūs, kad pipetės antgaliu nepaliesumėte šulinėlio vidinio paviršiaus ir neparardintumėte jo viršaus į mėginius ar kontrolines medžiagas. Gali atsirasti užteršimas.

8. Baigę antrąjį inkubavimą, išplaukite šulinėlius, kaip aprašyta anksčiau (l.3 skirsnis).

9. Pipete įpilkite 100 μl chromogeno/substrato į visus šulinėlius, įskaitant A1+B1.

Svarbi pastaba: nelaikykite ant stiprios tiesioginės šviesos, nes gali susiformuoti aukštas fonas.

10. Inkubuokite kambario temperatūroje (18-24°C) 20 minučių. Šulinėliuose, kuriose yra teigiamų mėginių, kontrolinis serumas ir teigiami kalibratoriai, taip pat iš skaidrių taps mėlynos spalvos.

11. Pipete įpilkite 100 μl sieros rūgšties į visus šulinukus, naudodami tą pačią pipetavimo seką, kaip ir 9 veiksmo, kad sustabdytumėte fermentinę reakciją. Pridėjus stabdymo tirpalo, teigiamas kontrolinis ir teigiami mėginiai pakis iš mėlynos į geltoną spalvą.

12. Išmatuokite tirpalo spalvos intensyvumą kiekvienoje duobutėje, kaip aprašyta l.5 skirsnyje, naudodami 450 nm filtrą (skaitymas) ir 620–630 nm filtrą (fono atėmimas, privalomas).

M.2 Kokybinė analizė

1. Įdėkite reikiamą skaičių juostelių į plastikinį laikiklį ir atsargiai nustatykite šulinėlius standartams bei mėgininiams.

2. Atskieskite mėginius santykiu 1:101, į vienkartinį mėgintuvėlį išpilstydami 1 ml mėginio skiediklio ir tada 10 ul mėginio; prieš naudojimą sumaišykite ant vortekso. Neskieskite kalibratorių, nes jie yra paruošti naudoti.

3. Palikite A1 šulinėlį tuščią, kad būtų galima jį naudoti kaip blanką.

4. Pipete išpilstykite 100 μl kalibratoriaus 0 V/ml dubliais, 100 μl kalibratoriaus 10 V/ml dubliais ir 100 μl kalibratoriaus 100 V/ml vieną kartą. Tada išpilstykite 100 μl atskiestų mėginių į atitinkamus mėginių šulinėlius. Patikrinkite, ar teisingai įdėti kalibratoriai ir mėginiai.

5. Mikroplokštelę inkubuokite **60 min +37°C temperatūroje**.

Svarbi pastaba: Juostelės turi būti sandarinamos lipnia sandarinimo folija, tik tada, kai bandymas atliekamas rankiniu būdu. Neuždenkite juostelių, kai naudojate ELISA automatinius instrumentus.

6. Baigę pirmąjį inkubavimą, išplaukite šulinėlius, kaip aprašyta anksčiau (l.3 skirsnis).

7. Į visus šulinukus, išskyrus A1, pipete įpilkite 100 μl fermento konjugato. Mikroplokštelę inkubuokite **60 min +37°C temperatūroje**.

Svarbi pastaba: būkite atsargūs, kad pipetės antgaliu nepaliesumėte šulinėlio vidinio paviršiaus ir neparardintumėte jo viršaus į mėginius ar kontrolines medžiagas. Gali atsirasti užteršimas.

8. Baigę antrąjį inkubavimą, išplaukite šulinėlius, kaip aprašyta anksčiau (l.3 skirsnis).

9. Pipete įpilkite 100 μl chromogeno/substrato į visus šulinėlius, įskaitant A1.

Svarbi pastaba: nelaikykite ant stiprios tiesioginės šviesos, nes gali būti sukurtas aukštas fonas.

10. Inkubuokite mikroplokštelę, apsaugotą nuo šviesos, kambario temperatūroje (18-24°C) 20 minučių. Šulinėliuose, kuriose yra teigiamų mėginių, kontrolinis serumas ir teigiami kalibratoriai, taip pat iš skaidraus taps mėlynos spalvos.

11. Pipete įpilkite 100 μl sieros rūgšties į visus šulinėlius naudodami tą pačią pipetavimo seką, kaip ir 9 veiksmo, kad sustabdytumėte fermentinę reakciją. Pridėjus stabdymo tirpalo teigiamą kontrolę ir teigiamus mėginius pakis iš mėlynos į geltoną spalvą.

12. Išmatuokite tirpalo spalvos intensyvumą kiekvienoje duobutėje, kaip aprašyta l.5 skirsnyje, naudodami 450 nm filtrą (skaitymas) ir 620–630 nm filtrą (fono atėmimas, privalomas).

Svarbios pastabos:

1. Prieš skaitydami įsitikinkite, kad mikrošulinėlio apačioje nėra pirštų atspaudų. Pirštų atspaudai gali sukelti klaidingai teigiamus skaitymo rezultatus.

2. Idealiu atveju skaitymas turėtų būti atliktas iš karto po stabdymo tirpalo pridėjimo, bet ne ilgiau kaip po 20 minučių. Gali įvykti tam tikra chromogeno savaiminė oksidacija, dėl kurios susidaro aukštesnis fonas.

3. Kontrolinis serumas (KS) neturi įtakos ribinės vertės skaičiavimui, taigi ir tyrimo rezultatų apskaičiavimui. Kontrolinį serumą galima naudoti tik tada, kai vadovybė reikalauja atlikti vidinę laboratorijos kokybės kontrolę.

N. TYRIMO SCHEMA

Tyrimo protokolą galima apibendrinti toliau pateiktoje lentelėje:

Kalibratoriai ir praskiesti mėginiai bei ištirpintas kontrolinis serumas	100 ul
1^a inkubacija	60 min
Temperatūra	+37°C
Plovimo žingsniai	n° 5 ciklai su 20 sek. mirkymu ARBA n° 6 ciklai be mirkymo
Fermentų konjugatas	100 ul
2^a inkubacija	60 min
Temperatūra	+37°C
Plovimo žingsniai	n° 5 ciklai su 20 sek. mirkymu ARBA n° 6 ciklai be mirkymo
Chromogenas/Substratas	100ul
3-ia inkubacija	20 min
Temperatūra	Kambario
Sieros rūgštis	100 ul
OD skaitymas	450nm /620-630nm

Toliau pateikiamas kiekybinių tyrimų pasiskirstymo schemos pavyzdys:

Mikroplokštelė

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1									
B	BLK	CAL4	S2									
C	CAL1	CAL5	S3									
D	CAL1	CAL5	S4									
E	CAL2	CAL6	S5									
F	CAL2	CAL6	S6									
G	CAL3	CS	S7									
H	CAL3	CS	S8									

Legenda: BLK = Blank // CAL = kalibratoriai
CS = kontrolinis serumas // S = mėginys

Toliau pateikiamas kokybinių tyrimų paskirstymo schemos pavyzdys:

Mikroplokštelė

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11									
B	CAL1	S 4	S 12									
C	CAL1	S 5	S 13									
D	CAL3	S 6	S 14									
E	CAL3	S 7	S 15									
F	CAL6	S 8	S 16									
G	S 1	S 9	S 17									
H	S 2	S 10	S 18									

Legenda: BLK = Blank // CAL = kalibratoriai // S = mėginys

O. VIDINĖ KOKYBĖS KONTROLĖ Kaskart, kai naudojamas rinkinys, atliekama kontrolinių elementų patvirtinimo patikra, siekiant patikrinti, ar tyrimo rezultatai atitinka reikalavimus. Kontroliuokite, kad šie duomenys atitiktų:

Parametrai	Reikalavimai
Blankas	< 0.100 OD450nm
Kalibratorius 0 PEI U/ml	< 0.150 OD450nm po blanko atėmimo
Variacijos koeficientas	< 30%
Kalibratorius 5 PEI U/ml	OD450nm > OD450nm Cal 0 U/ml + 5SD ir šiaip > OD450nm Cal 0 U/ml + 0.100
Kalibratorius 10 PEI U/ml	OD450nm > OD450nm Cal 0 U/ml + 0.200
Kalibratorius 100 PEI U/ml	> 1.000 OD450nm
Kontrolinis Serumas	OD450nm = OD450nm iš kalibratoriaus 20 U/ml ± 10%

Jei testo rezultatai atitinka aukščiau nurodytus reikalavimus, pereikite prie kito skyriaus.

Jei ne, daugiau nebetęskite ir atlikite šiuos patikrinimus:

Problemos	Patikrinti
Blankas > 0.100 OD450nm	1. kad chromogeno/substrato tirpalas nebuvo užterštas tyrimo metu
Kalibratorius 0 U/ml > 0.150 OD450nm po blanko atėmimo	1. ar plovimo procedūra ir plokštelės plovimo įrangos nustatymai yra tokie, kaip patvirtinta išankstinio kvalifikacinio tyrimo metu;
Variacijos koeficientas >30%	2. ar buvo panaudotas tinkamas plovimo tirpalas ir prieš naudojimą įranga buvo juo praplauta;
	3. ar atliekant tyrimo procedūrą nebuvo padaryta klaidų (teigiamų kalibratorių sumaišymas vietoj Cal 0);
	4. Ar Cal 0 arba šulinėliai, kuriuose jis buvo išpiltas, nebuvo užteršti dėl teigiamų mėginių, išsiliejimo ar fermento konjugato;
	5. Jog mikropipetės nebūtų užterštos

	su teigiamais mėginiais arba su fermento konjugatu 6. Jog plovimo adatos nebūtų užsikimšusios arba iš dalies užsikimšusios.
Kalibratorius 5 U/ml < CAL 0 + 5SD or < CAL 0 + 0.100	1. 1. kad procedūra buvo atlikta teisingai; 2. 2. kad jo paskirstymo metu neįvyko klaida; 3. 3. ar plovimo procedūra ir plokštelės plovimo įrenginio nustatymai yra tokie, kaip patvirtinta išankstiniame kvalifikacijos tyrimo; 4. 4. kad nebuvo išorinio kalibratoriaus užteršimo.
Kalibratorius 10 U/ml < CAL 0 + 0.200	1. 1. kad procedūra buvo atlikta teisingai; 2. 2. kad jo paskirstymo metu neįvyko klaida; 3. 3. ar plovimo procedūra ir plokštelės plovimo įrenginio nustatymai yra tokie, kaip patvirtinta išankstiniame kvalifikacijos tyrimo; 4. 4. kad nebuvo išorinio kalibratoriaus užteršimo.
Kalibratorius 100 U/ml < 1.000 OD450nm	1. 1. kad procedūra buvo atlikta teisingai; 2. 2. kad jo paskirstymo metu neįvyko klaida; 3. 3. ar plovimo procedūra ir plokštelės plovimo įrenginio nustatymai yra tokie, kaip patvirtinta išankstiniame kvalifikacijos tyrimo; 4. 4. kad nebuvo išorinio kalibratoriaus užteršimo.
Kontrolinis serumas Skiriasi nuo numatomos vertės	Pirmiausia patikrinkite, ar: 1. procedūra atlikta teisingai; 2. paskirstant neįvyko jokia klaida (pvz.: netinkamo mėginio išpildymas); 3. plovimo procedūra ir plovimo įrenginio nustatymai yra teisingi; 4. neįvyko išorinis standarto užteršimas. 5. kontrolinis serumas buvo ištirpintas tinkamu kiekiu, nurodytu etiketėje. Jei buvo įvykdyta klaida, pašalinus šios klaidos priežastį, tyrimas turi būti kartojamas. Jei klaidų nerasta, atlikite šiuos veiksmus: a) gaunama vertė iki +/-20 % bendros laboratorijos tikslumo gali neleisti bandymui atitikti laukiamos vertės +/-10 % . Praneškite apie problemą prižiūrėtojui, kad šis priimtų arba atsisakytų priimti šį rezultatą. b) gaunama didesnė nei +/-20 % reikšmė: šiuo atveju testas negalioja ir reikia skambinti DiaPro klientų aptarnavimo tarnybai.

Jei iškilo kuri nors iš aukščiau išvardytų problemų, praneškite apie problemą vadovui, kad būtų galima imtis tolesnių veiksmų.

Svarbi pastaba:

Analizė turi būti atliekama taip, kaip aprašyta M skyriaus 12 punkte.

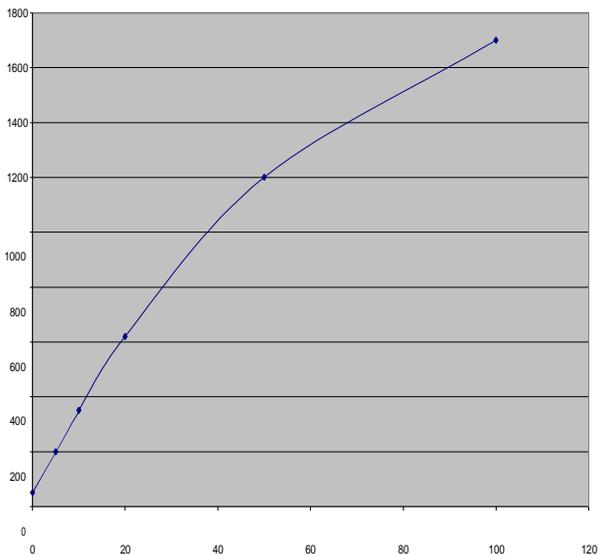
O. REZULTATAI

O.1 Kiekybinis metodas

Jei testas pasitvirtina, kiekybiniam metodui naudokite patvirtintą kreivės pritaikymo programą, kad nubrėžtumėte kalibravimo kreivę iš verčių, gautų nuskaitant esant 450 nm/ ir 620–630 nm (siūloma 4 parametrų kreivė).

Tada pagal kalibravimo kreivę apskaičiuokite anti HBc IgM antikūnų koncentraciją mėginiuose.

Kalibravimo kreivės pavyzdys pateiktas žemiau.



Svarbi pastaba: nenaudokite šio pavyzdžio, kad padarytumėte tikrą pavyzdžių skaičiavimai.

N.1 Kokybinis metodas

Taikant kokybinį metodą, apskaičiuokite vidutines OD450nm/620-630nm vertes kalibratoriams 0 ir 10 U/ml ir patikrinkite, ar tyrimas yra tinkamas.

Skaičiavimo pavyzdys (duomenys gauti atliekant skaitymo etapą, aprašytą M skyriaus 12 punkte).

Šie duomenys neturi būti naudojami vietoj realių naudotojo gautų skaičių.

Kalibratorius 0 U/ml: 0,020–0,024 OD450nm
 Vidutinė vertė: 0,022 OD450nm, mažesnė nei 0,150 – priimtina
 Kalibratorius 10 U/ml: 0,350 – 0,330 OD450nm
 Vidutinė vertė: 0,340 OD450nm Didesnė nei Cal 0 + 0,200 –
 Priimtas kalibratorius 100 U/ml: 2,845 OD450nm Didesnis nei 1 000 – Priimtinas

O. REZULTATŲ AIŠKINIMAS

O.1 Kokybiniai rezultatai

Kokybiniam aiškinimui medicinos literatūroje paprastai atsižvelgiama į teigiamus mėginius, kuriuose yra HBc IgM koncentracija.

> 10 PEI U/ml.

Todėl tyrimo rezultatai interpretuojami kaip mėginio OD450nm ir Cal 10 PEI U/ml (arba S/Co) OD450nm/620-630nm santykis pagal šią lentelę:

S/Co	Interpretacija
< 0.9	Neigiamas
0.9 - 1.1	Dviprasmiškas
> 1.1	Teigiamas

N.1 Kiekybiniai rezultatai

Kalibravimo kreivė naudojama IgM antikūnų prieš HBcAg koncentracijai mėginiuose nustatyti.

Mėginiai, kurių koncentracija mažesnė nei 5 PEI U/ml, laikomi neigiamais HBcIgM.

Mėginiai, kurių koncentracija yra nuo 5 iki 10 PEI U/ml, laikomi pilkojoje zonoje.

Tačiau, stebint lėtinį hepatitą, didesnės nei 5 PEI U/ml vertės gali būti laikomos teigiamomis HBcIgM, kai yra kitų klinikių požymių.

Mėginiai, kurių koncentracija didesnė nei 10 PEI U/ml, laikomi teigiamais HBcIgM.

Svarbios bendros pastabos:

- Kai rezultatus apskaičiuoja ELISA automatizuotos darbo stoties operacinė sistema, įsitikinkite, kad kalibravimo kreivei sudaryti, mėginio koncentracijai apskaičiuoti ir teisingai interpretuoti rezultatus naudojama tinkama formulė.
- Rezultatai turėtų būti interpretuojami prižiūrint laboratorijos vadovui, kad būtų sumažinta sprendimo klaidų ir klaidingų interpretacijų rizika.
- Teigiamas rezultatas rodo HBV infekciją, todėl pacientą reikia atitinkamai gydyti.
- Kai tyrimų rezultatai perduodami iš laboratorijos į kitą įstaigą, reikia atkreipti dėmesį į tai, kad būtų išvengta klaidingo duomenų perdavimo.
- Virusinio hepatito diagnozę turi nustatyti ir pacientui išleisti tinkamos kvalifikacijos gydytojas.

R. Atlikimas

Veiklos vertinimas buvo atliktas pagal tai, kas nurodyta Bendrosiose techninėse specifikacijose arba CTS (IVD direktyvos 98/79/EB 5 straipsnis, 3 skyrius).

1. Aptikimo riba

Tyrimo aptikimo riba buvo apskaičiuota naudojant:

1.1 HBcIgM etaloninis preparatas, tiekiamas Paulo Ericho instituto, Vokietija (HBc-Referenzserum-IgM 84), ant kurio buvo kalibruota standartinė kreivė.

1.2 Accurun 113 (kat. Nr. A113-5001), tiekė Boston Biomedica Inc., JAV

Trijų partijų kokybės kontrolės rezultatai pateikti šiose lentelėse:

BCM.CE	Lot #	0103	Lot #	0103/2	Lot #	0303
PEI U/ml	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
100	2.752	8.9	2.883	9.7	2.911	9.1
50	1.917	6.2	1.972	6.7	2.053	6.4
20	0.980	3.2	0.914	3.1	1.095	3.4
10	0.544	1.8	0.513	1.7	0.592	1.8
5	0.310	1.0	0.296	1.0	0.321	1.0
2.5	0.155	0.5	0.149	0.5	0.161	0.5
1.25	0.084	0.3	0.084	0.3	0.093	0.3
negative	0.040		0.035		0.044	

BBI Accurun # 113 lot # 48-9999-0621

BCM.CE	Lot #	0103	Lot #	0103/2	Lot #	0303
BBI 113	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1 x	3.336	10.8	3.195	10.4	3.269	10.3
2 x	2.472	8.0	2.385	7.8	2.385	7.5
4 x	1.467	4.7	1.413	4.6	1.429	4.5
8 x	0.865	2.8	0.807	2.6	0.856	2.7
16 x	0.430	1.4	0.427	1.4	0.410	1.3
32 x	0.234	0.8	0.234	0.8	0.248	0.8
64 x	0.129	0.4	0.133	0.4	0.122	0.4
128 x	0.086	0.3	0.082	0.3	0.089	0.3
negative	0.040		0.040		0.052	

Be to, BBI skydelis # PHE 102 taip pat buvo ištirtas trijose gaminių partijose; duomenys pateikiami toliau, remiantis Europos rinkiniu (BBI rezultatai).

BBI – Panel code PHE 102

	Lot # 0103	Lot # 0103/2	Lot # 0303	Sorin EIA
Member	S/Co	S/Co	S/Co	S/Co
01	6.7	6.3	6.5	2.0
02	11.3	10.0	10.7	6.1
03	9.5	7.2	8.4	3.0
04	5.8	3.4	4.1	2.1
05	11.3	11.4	11.2	3.1
06	12.1	11.6	11.8	4.1
07	0.1	0.1	0.1	0.2
08	9.2	8.5	8.8	2.3
09	12.2	11.7	11.9	4.2
10	11.7	10.2	10.8	2.8
11	5.9	5.8	5.8	2.1
12	12.7	11.4	11.7	5.2
13	11.6	11.0	11.3	3.6
14	7.0	6.3	6.6	2.3
15	12.4	11.5	11.8	4.5

1. Diagnostinis jautrumas:

Ji apibrėžiama kaip tikimybė, kad tyrimas bus teigiamas esant konkrečiai analizei.

Diagnostinis jautrumas buvo ištirtas vidinėse ir išorinėse kvalifikuotose klinikinės laboratorijos mėginių grupėse, kurios pagal JAV FDA patvirtintą rinkinį klasifikuojamos teigiamai.

Teigiami mėginiai buvo paimti iš skirtingų pacientų ir skirtingų HBV patologijų (ūminio ir lėtinio hepatito).

Tyrimė, atliktame iš viso daugiau nei 200 mėginių, nustatyta bendra vertė > 98 %.

Taip pat buvo ištirtas serokonversijos panelė, pagaminta BBI, JAV, kodas # PHM 935A; Rezultatai pateikiami žemiau su nuoroda į du komercinius rinkinius (BBI rezultatai).

BBI Panel PHM 935A

	Lot # 0103	Abbott EIA	DiaSorin EIA
Member #	S/Co	S/Co	S/Co
01	0.2	0.1	0.1
02	0.2	0.1	0.1
03	0.2	0.1	0.1
04	0.1	0.1	0.1
05	0.2	0.1	0.1
06	0.2	0.1	0.1
07	0.2	0.1	0.1
08	0.1	0.1	0.1
09	0.1	0.1	0.1
10	0.1	0.1	0.1
11	0.2	0.1	0.1
12	0.2	0.1	0.1
13	2.8	3.7	0.7
14	5.0	6.4	0.9
15	> 12	6.2	4.5
16	> 12	5.6	4.5
17	> 12	5.5	4.3
18	> 12	4.8	4.3
19	> 12	> 6.6	4.4
20	> 12	> 6.6	5.2

1. Diagnostinis specifiškumas:

Ji apibrėžiama kaip tikimybė, kad tyrimas bus neigiamas, jei nėra konkrečios analizės.

Diagnostinis specifiškumas buvo ištirtas vidinėse ir išorinėse kvalifikuotose klinikinės laboratorijos mėginių grupėse, naudojant neigiamus normalių asmenų ir kraujo donorų mėginius, klasifikuojamus kaip neigiamus, naudojant JAV FDA patvirtintą rinkinį.

Iš viso buvo ištirta daugiau nei 400 neigiamų mėginių. Nustatytas > 98 % diagnostinis specifiškumas.

Be to, diagnostinis specifiškumas buvo įvertintas ištyrus daugiau nei 50 galimai trukdančių mėginių (kitos infekcinės ligos, pacientai, sergantys neviršūnėmis kepenų ligomis, pacientai, kuriems atliekama dializė, nėščios moterys, hemoliziniai, lipemiški ir kt.).

Tyrimo metu trukdžių nepastebėta.

Plazma, gauta naudojant skirtingus standartinius paruošimo būdus (citratas, EDTA ir heparinas), ir serumai

naudojamas specifiškumui nustatyti. Klaidingo reaktyvumo dėl mėginio paruošimo metodo nepastebėta.

Taip pat buvo išbandyti užšaldyti mėginiai, siekiant patikrinti, ar tai netrukdo atlikti bandymą. Nebuvo pastebėta jokių trukdžių švarems ir be dalelių mėginiams.

1. Tikslumas:

Jis buvo apskaičiuotas pagal tris mėginius, ištirtus 16 pakartojimų trimis skirtingais bandymais, atliktais su trimis skirtingomis partijomis. Rastos vertės buvo tokios:

BCM.CE: lot # 0103

Cal 0 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.055	0.053	0.051	0.053
Std.Deviation	0.005	0.006	0.005	0.006
CV %	9.9	12.3	10.7	10.9

Cal 5 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.324	0.308	0.321	0.318
Std.Deviation	0.022	0.018	0.024	0.021
CV %	6.8	5.7	7.5	6.7

Cal 50 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	2.109	2.048	2.052	2.070
Std.Deviation	0.101	0.088	0.136	0.109
CV %	4.8	4.3	6.7	5.2

BCM.CE: lot # 0103/2

Cal 0 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.057	0.053	0.054	0.055
Std.Deviation	0.005	0.005	0.004	0.004
CV %	8.3	9.0	7.3	8.2

Cal 5 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.332	0.331	0.322	0.328
Std.Deviation	0.017	0.018	0.016	0.017
CV %	5.0	5.5	4.9	5.1

Cal 50 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	2.311	2.208	2.212	2.244
Std.Deviation	0.110	0.090	0.095	0.098
CV %	4.7	4.1	4.3	4.4

BCM.CE: lot # 0303

Cal 0 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.043	0.042	0.040	0.042
Std.Deviation	0.004	0.005	0.004	0.004
CV %	10.3	11.1	10.9	10.8

Cal 5 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	0.320	0.326	0.314	0.320
Std.Deviation	0.023	0.024	0.026	0.024
CV %	7.1	7.4	8.2	7.6

Cal 50 U/ml (N = 16)

Vidutinės vertės	1st run	2nd run	3rd run	Vidutinės vertės
OD 450nm	2.150	2.163	2.092	2.135
Std.Deviation	0.057	0.067	0.076	0.067
CV %	2.6	3.1	3.6	3.1

Svarbi pastaba:

Veikimo duomenys buvo gauti atliekant skaitymo etapą, aprašytą M skyriaus 12 punkte.

P. APRIBOJIMAI

Užšaldyti mėginiai, kuriuose yra fibrino dalelių arba agregatų, galima gauti klaidingai teigiamus rezultatus.

Mėginio užteršimas bakterijomis arba inaktyvavimas karščiu gali paveikti mėginių absorbcijos vertes ir dėl to pasikeisti analitės lygis. Šis testas tinkamas tirti tik pavienius mėginius, o ne jungtinius. Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatoma remiantis vienu tyrimo rezultatu. Reikia atsižvelgti į paciento klinikinę istoriją, simptomus ir kitus diagnostinius duomenis.

Nuorodos

1. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135,1971
3. Remington J.S. and Klein J.O.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Snyderman D.R., Bryan J.A. and Dixon R.E.. Ann.Int.Med., 83, pp 838, 1975.
6. Barker L.F., Gerety R.J., Lorenz D.E.. Viral Hepatitis. 581-587, 1978.
7. Cossart Y.. Brit.Med.Bull.. 28, pp 156, 1972
8. Lander J.J., Alter H. and Purcell R.. J.Immunol.. 106, pp 1066, 1971
9. Mushawar I.K., Dienstag J.L., Polesky H.F. et al.. Ann.J.Clin.Pathol.. 76, pp 773, 1981.
10. Grebenchtchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002
11. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

Visi įmonės gaminami IVD produktai yra kontroliuojami pagal sertifikuotą kokybės valdymo sistemą, patvirtintą EB notifikuotosios įstaigos. Kiekviena partija pateikiama kokybės kontrolei ir išleidžiama į rinką tik tada, kai atitinka EB technines specifikacijas ir priėmimo kriterijus.

Gamintojas:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



0318

HBc IgM

**“Capture” Enzyme ImmunoAssay (ELISA)
for the quantitative/qualitative
determination of IgM class antibody to
Hepatitis B Virus core Antigen
in human plasma and sera**

- for “in vitro” diagnostic use only -



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy**

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF BCM.CE
96 Tests

2.6.1.a-HBc IgM antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 96 testai. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 4 šulinėliai.

HBc IgM

A. INTENDED USE

Enzyme ImmunoAssay (ELISA) for the quantitative/qualitative determination of IgM class antibodies to Hepatitis B Virus core Antigen in human plasma and sera with the "capture" system.

The kit is intended for the classification of the viral agent and for the follow-up of chronic patients under therapy. For "in vitro" diagnostic use only.

B. INTRODUCTION

Hepatitis B core Antigen (or HBcAg) is the major component of the core particles of Hepatitis B virus (or HBV).

Particles have a size of 27nm and contain a circular double-stranded DNA molecule, a specific DNA-polymerase and HBcAg. HBcAg is composed of a single polypeptide of about 17 kD that is released upon disaggregation of the core particles ; the antigen contains at least one immunological determinant.

Upon primary infection, anti HBcAg IgM antibodies are one of the first markers of HBV hepatitis appearing in the serum of the patient, together or slightly later than HBsAg, the viral surface antigen.

Anti HBcAg IgM titers, very high during the acute phase, decrease along the illness, as IgG antibodies appear, down to undetectable levels in convalescent patients.

In chronic hepatitis, however, spikes of anti HBcAg IgM synthesis are present, confirming reactivation of HBV in hepatocytes and giving origin to permanent IgM low titers.

The determination of anti HBcAg IgM antibodies has become very important for the fast classification of the virus, of the phase of the illness and for the monitoring of patients under treatment with interferon.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The assay is based on the principle of "IgM capture" where IgM class antibodies in the sample are first captured by the solid phase coated with anti hIgM antibody.

After washing out all the other components of the sample and in particular IgG antibodies, the specific IgM captured on the solid phase are detected by the addition of a purified preparation of recombinant HBcAg, labelled with a monoclonal antibody conjugated with peroxidase (HRP).

After incubation, microwells are washed to remove unbound conjugate and then the chromogen/substrate is added.

In the presence of peroxidase the colourless substrate is hydrolysed to a coloured end-product, whose optical density may be detected and is proportional to the amount of IgM antibodies to HBcAg present in the sample.

D. COMPONENTS

Each kit contains sufficient reagents to perform 96 tests.

1. Microplate: MICROPLATE

8x12 microwell strips coated with purified anti human IgM specific mouse monoclonal antibody, post-coated with bovine serum proteins and sealed into a bag with desiccant. Allow the microplate to reach room temperature before opening; reseal unused strips in the bag with desiccant and store at 4°C.

2. Calibration Curve: CAL N° ...

6x2.0 ml/vial. Ready to use and color coded standard curve calibrated on the HBcIgM reference preparation supplied by Paul Ehrlich Institute (HBc-Referenzserum-IgM 84), ranging: CAL1 = 0 U/ml // CAL2 = 5 U/ml // CAL3 = 10 U/ml // CAL4 = 20 U/ml // CAL 5 = 50 U/ml // CAL 6 = 100 U/ml.

It contains chemical inactivated HBcIgM positive human plasma, 100 mM Tris buffer pH 7.4+/-0.1, 0.5% Tween 20, 0.09% sodium azide and 0.045% ProClin 300 as preservatives. The Calibration Curve is coded with blue alimentary dye.

Important Note: Even if plasma has been chemically inactivated, handle this component as potentially infectious.

3. Wash buffer concentrate: WASHBUF 20X

1x60ml/bottle. 20x concentrated solution.

Once diluted, the wash solution contains 10 mM phosphate buffer pH 7.0+/-0.2, 0.05% Tween 20 and 0.045% ProClin 300.

4. Enzyme Conjugate (Immunocomplex) : CONJ

1x16.0 ml/vial. Ready-to-use solution. Contains an immunocomplex formed by a specific mouse monoclonal antibody, labelled with HRP, and a purified recombinant HBcAg. The reagent is dissolved into a buffer solution 10 mM Tris buffer pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.045% ProClin 300 and 0.02% gentamicine sulphate as preservatives. The component is red colour coded.

5. Specimen Diluent : DILSPE

2x60.0 ml/vial. Buffered solution for the dilution of samples; it contains 100 mM Tris buffer pH 7.4+/-0.1, 0.5% Tween 20, 2% Casein, 0.045% ProClin 300 and 0.09% sodium azide as preservatives. The component is blue color coded.

6. Control Serum : CONTROL ...ml

1 vial. Lyophilized. Contains fetal bovine serum, human HBcIgM positive human plasma calibrated at 20 ± 10% PEI U/ml. 0.2 mg/ml gentamicine sulphate and 0.045% ProClin 300 as preservatives.

Important Notes

1. 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 .

2. Important Note: Even if plasma has been chemically inactivated, handle this component as potentially infectious.

7. Chromogen/Substrate : SUBS TMB

1x16ml/vial. Contains a 50 mM citrate-phosphate buffered solution at pH 3.5-3.8, 4% dimethylsulphoxide, 0.03% tetra-methyl-benzidine or TMB and 0.02% hydrogen peroxide or H₂O₂.

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

8. Sulphuric Acid: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contains 0.3 M H₂SO₄ solution.

Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

9. Plate sealing foils: n° 2

10. Package insert: n° 1

E. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (150ul, 100ul and 50ul) and disposable plastic tips.
2. EIA grade water (double distilled 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 (dry or wet) set at +37°C.
6. Calibrated ELISA microwell reader with 450nm (reading) and 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.
2. 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.
3. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
4. 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 Chromogen/Substrate (TMB) from strong light and avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken.
5. Upon receipt, store the kit at 2-8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
6. 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.
7. 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.
8. Avoid cross-contamination between serum/plasma samples by using disposable tips and changing them after each sample. Do not reuse disposable tips.
9. Avoid cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them between the use of each one. Do not reuse disposable tips.
10. Do not use the kit after the expiration date stated on external (primary container) and internal (vials) labels.
11. 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.
12. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the washing solution or in transferring components into other containers of automated workstations, in order to avoid contamination.
13. 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. 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..
14. Accidental spills 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.
15. The Stop Solution is an irritant. In case of spills, wash the surface with plenty of water
16. 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.

G. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMANDATIONS

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; 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.
4. Haemolysed 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 in primary collection tubes for up to five days after collection. Do not freeze primary tubes of collection. For longer storage periods, sera and plasma samples, carefully removed from the primary collection tube, can be stored frozen at -20°C for at least 12 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 0.2-0.8u 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 6 re-uses of the device and up to 3 months.

Microplate:

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

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

Calibration Curve:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Wash buffer concentrate:

The whole content of the 20x concentrated solution has to be diluted with bidistilled water up to 1200ml and mixed gently end-over-end before use.

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.

Enzyme conjugate:

Ready to use. Mix well on vortex before use.

Avoid contamination of the liquid with oxidizing chemicals, dust or microbes. If this component has to be transferred, use only plastic, and if possible, sterile disposable containers.

Specimen Diluent

Ready to use. Mix on vortex before use.

Control Serum

Dissolve the content of the vial with EIA grade water as reported in the label. Mix well on vortex before use. The dissolved control serum is ready to use.

Note: The control after dissolution is not stable. Store frozen in aliquots at -20°C.

Chromogen/Substrate:

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 light, oxidizing agents and metallic surfaces.
If this component has to be transferred use only plastic, and if possible, sterile disposable container

Sulphuric Acid:

Ready to use. Mix well on vortex before use.
Attention: Irritant (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Legenda:

Warning H statements:

H315 – Causes skin irritation.
H319 – Causes serious eye irritation.

Precautionary P statements:

P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302 + P352 – IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P332 + P313 – If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
P305 + P351 + P338 – IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337 + P313 – If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
P362 + P363 – Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

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. They should also be regularly maintained. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of $\pm 2\%$.
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 in advance, checked for the delivery of the right dispensation volume and regularly submitted to maintenance according to the manufacturer's instructions for use. In particular the washer, at the end of the daily workload, has to be extensively cleaned out of salts with deionized water. Before use, the washer has to be extensively primed with the diluted Washing Solution. The instrument weekly has to be submitted to decontamination according to its manual (NaOH 0.1 M decontamination suggested).
5 washing cycles (aspiration + dispensation of 350ul/well of washing solution + 20 sec soaking = 1 cycle) are sufficient to ensure the assay with the declared performances. If soaking is not possible add one more cycle of washing.
An incorrect washing cycle or salt-blocked needles are the major cause of false positive reactions.
4. Incubation times have a tolerance of $\pm 5\%$.
5. The ELISA reader has to be equipped with a reading filter of 450nm and with a second filter of 620-630nm, mandatory for blanking purposes. Blanking is carried out on the well identified in the section "Assay Procedure". The optical

system of the reader has to be calibrated regularly to ensure 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, data handling) have to be carefully set, calibrated, controlled and regularly serviced in order to match the values reported in the sections "Validation of Test" and "Assay Performances". 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 and for washing. This must be studied and controlled to minimize the possibility of contamination of adjacent wells. The use of ELISA automated work stations is recommended when the number of samples to be tested exceed 20-30 units per run.
7. Dia.Pro's customer service offers support to the user in the setting and checking of instruments used in combination with the kit, in order to assure compliance with the requirements described. Support is also provided for the installation of new instruments to be used with the kit.

L. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label (primary container). Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by visible particles or aggregates. Check that the Chromogen/Substrate (TMB+H₂O₂) is colourless or pale blue by aspirating a small volume of it with a sterile plastic pipette. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box (primary container). Check that the aluminium pouch, containing the microplate, is not punctured or damaged.
3. Dilute all the content of the 20x concentrated Wash Solution as described above.
4. Dissolve the Control Serum as described above and gently mix.
5. Allow all the other components to reach room temperature (about 1 hr) and then mix gently on vortex all liquid reagents.
6. Set the ELISA incubator at $+37^{\circ}\text{C}$ and prepare the ELISA washer by priming with the diluted washing solution, according to the manufacturers instructions. Set the right number of washing cycles as reported in the specific section.
7. Check that the ELISA reader is turned on or ensure it will be turned on at least 20 minutes before reading.
8. If using an automated work station, turn 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.

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.

Two procedures can be carried out with the device according to the request of the clinician.

M.1 Quantitative analysis

1. Place the required number of strips in the plastic holder and carefully identify the wells for standards and samples.

- Dilute samples **1:101** dispensing 1 ml Sample Diluent into a disposable tube and then 10 µl sample; mix on vortex before use. Do not dilute the Calibrators and the dissolved Control Serum as they are ready-to-use.
- Leave the A1+B1 wells empty for blanking purposes.
- Pipette 100 µl of the Calibrators in duplicate, 100 µl dissolved Control Serum in duplicate followed by 100 µl of diluted samples. The Control Serum is used to verify that the whole analytical system works as expected. Check that Calibrators, Control Serum and samples have been correctly added.
- Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- When the first incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- In all the wells except A1+B1, pipette 100 µl Enzyme Conjugate. Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip and not to immerse the top of it into samples or controls. Contamination might occur.

- When the second incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1+B1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light. as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**. Wells dispensed with positive samples, the control serum and the positive calibrators, as well, will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9 to block the enzymatic reaction.. Addition of the 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 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

M.2 Qualitative analysis

- Place the required number of strips in the plastic holder and carefully identify the wells for standards and samples.
- Dilute samples **1:101** dispensing 1 ml Sample Diluent into a disposable tube and then 10 µl sample; mix on vortex before use. Do not dilute the Calibrators as they are ready-to-use.
- Leave the A1 well empty for blanking purposes.
- Pipette 100 µl Calibrator 0 U/ml in duplicate, 100 µl Calibrator 10 U/ml in duplicate and 100 µl Calibrator 100 U/ml in single. Then dispense 100 µl diluted samples in proper sample wells. Check that Calibrators and samples have been correctly added.
- Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Strips have to be sealed with the adhesive sealing foil, only when the test is performed manually. Do not cover strips when using ELISA automatic instruments.

- When the first incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- In all the wells except A1, pipette 100 µl Enzyme Conjugate. Incubate the microplate **for 60 min at +37°C**.

Important note: Be careful not to touch the inner surface of the well with the pipette tip and not to immerse the top of it into samples or controls. Contamination might occur.

- When the second incubation is finished, wash the microwells as previously described (section I.3)
- Pipette 100 µl Chromogen/Substrate into all the wells, A1 included.

Important note: Do not expose to strong direct light. as a high background might be generated.

- Incubate the microplate protected from light at **room temperature (18-24°C) for 20 minutes**. Wells dispensed with positive samples, the control serum and the positive calibrators, as well, will turn from clear to blue.
- Pipette 100 µl Sulphuric Acid into all the wells using the same pipetting sequence as in step 9 to block the enzymatic reaction. Addition of the 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 using a 450nm filter (reading) and a 620-630nm filter (background subtraction, mandatory), blanking the instrument on A1 or B1 or both.

Important notes:

- Ensure that no finger prints are present on the bottom of the microwell before reading. 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 chromogen can occur leading to a higher background.
- The Control Serum (CS) does not affect the cut-off calculation and therefore the test results calculation. The Control Serum may be used only when a laboratory internal quality control is required by the management

N. ASSAY SCHEME

The assay protocol can be summarized in the table below:

Calibrators & diluted samples & dissolved Control Serum	100 ul
1st incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Enzyme Conjugate	100 ul
2nd incubation	60 min
Temperature	+37°C
Washing steps	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Chromogen/Substrate	100ul
3rd incubation	20 min
Temperature	room
Sulphuric Acid	100 ul
Reading OD	450nm /620-630nm

An example of dispensation scheme in quantitative assays is reported below:

2.6.1.a-HBc IgM antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 96 testai. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 4 šulinėliai.

2.6.1.a-HBc IgM antikūnų nustatymui ELISA (IFA) metodu. Vienoje pakuotėje 96 testai. Visos tyrimo inkubacijos yra atliekamos stabilioje, 37°C temperatūroje. Kontrolėms 4 šulinėliai.

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S1										
B	BLK	CAL4	S2										
C	CAL1	CAL5	S3										
D	CAL1	CAL5	S4										
E	CAL2	CAL6	S5										
F	CAL2	CAL6	S6										
G	CAL3	CS	S7										
H	CAL3	CS	S8										

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators
CS = Control Serum // S = Sample

An example of dispensation scheme in qualitative assays is reported below:

		Microplate											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S 3	S 11										
B	CAL1	S 4	S 12										
C	CAL1	S 5	S 13										
D	CAL3	S 6	S 14										
E	CAL3	S 7	S 15										
F	CAL6	S 8	S 16										
G	S 1	S 9	S 17										
H	S 2	S 10	S 18										

Legenda: BLK = Blank // CAL = Calibrators// S = Sample

	with positive samples or with the enzyme conjugate 6. that the washer needles are not blocked or partially obstructed.
Calibrator 5 U/ml < CAL 0 + 5SD or < CAL 0 + 0.100	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 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.
Calibrator 10 U/ml < CAL 0 + 0.200	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during its distribution; 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.
Calibrator 100 U/ml < 1.000 OD450nm	1. that the procedure has been correctly performed; 2. that no mistake has occurred during the distribution of the 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.
Control Serum Different from expected value	First verify that: 1. the procedure has been correctly performed; 2. no mistake has occurred during its distribution (ex.: dispensation of a wrong sample); 3. the washing procedure and the washer settings are correct; 4. no external contamination of the standard has occurred. 5. the Control Serum has been dissolved with the right volume reported on the label. If a mistake has been pointed out, the assay has to be repeated after eliminating the reason of this error. If no mistake has been found, proceed as follows: a) a value up to +/-20% is obtained: the overall Precision of the laboratory might not enable the test to match the expected value +/-10%. Report the problem to the Supervisor for acceptance or refusal of this result. b) a value higher than +/-20% is obtained: in this case the test is invalid and the DiaPro's customer service has to be called.

O. INTERNAL QUALITY CONTROL

A validation check is carried out on the controls any time the kit is used in order to verify whether the performances of the assay are as qualified.

Control that the following data are matched:

Parameter	Requirements
Blank well	< 0.100 OD450nm
Calibrator 0 PEI U/ml coefficient of variation	< 0.150 OD450nm after blanking < 30%
Calibrator 0 PEI U/ml	OD450nm > OD450nm Cal 0 U/ml + 5SD and anyway > OD450nm Cal 0 U/ml + 0.100
Calibrator 10 PEI U/ml	OD450nm > OD450nm Cal 0 U/ml + 0.200
Calibrator 100 PEI U/ml	> 1.000 OD450nm
Control Serum	OD450nm = OD450nm of the Calibrator 20 U/ml ± 10%

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:

Problem	Check
Blank well > 0.100 OD450nm	1. that the Chromogen/Substrate solution has not become contaminated during the assay
Calibrator 0 U/ml > 0.150 OD450nm after blanking coefficient of variation > 30%	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 calibrators instead of Cal 0); 4. that no contamination of the Cal 0, or of the wells where this was dispensed, has occurred due to positive samples, to spills or to the enzyme conjugate; 5. that micropipettes have not become contaminated

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

Important note:

The analysis must be done proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

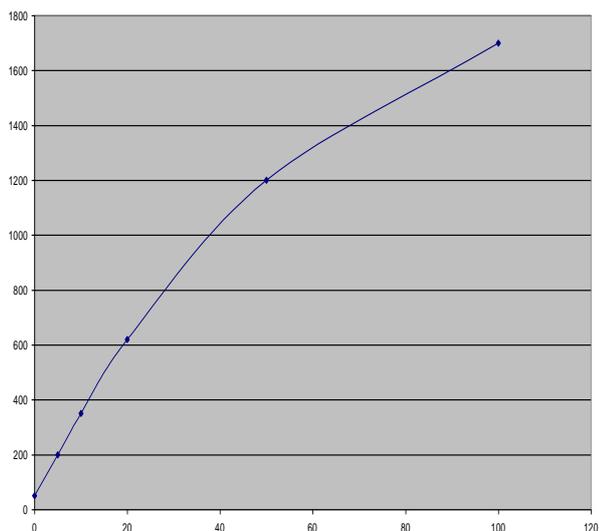
P. RESULTS

P.1 Quantitative method

If the test turns out to be valid, use for the quantitative method an approved curve fitting program to draw the calibration curve from the values obtained by reading at 450nm/620-630nm (4-parameters interpolation is suggested).

Then on the calibration curve calculate the concentration of anti HBc IgM antibody in samples.

An example of Calibration curve is reported below.



Important Note: Do not use this example to make real calculations on samples.

P.2 Qualitative method

In the qualitative method, calculate the mean OD450nm/620-630nm values for the Calibrators 0 and 10 U/ml and then check that the assay is valid.

Example of calculation (data obtained proceeding as the the reading step described in the section M, point 12).

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

Calibrator 0 U/ml: 0.020 – 0.024 OD450nm
 Mean Value: 0.022 OD450nm
 Lower than 0.150 – Accepted
 Calibrator 10 U/ml: 0.350 – 0.330 OD450nm
 Mean Value: 0.340 OD450nm
 Higher than Cal 0 + 0.200 – Accepted
 Calibrator 100 U/ml: 2.845 OD450nm
 Higher than 1.000 – Accepted

Q. INTERPRETATION OF RESULTS

Q.1 Qualitative results

For qualitative interpretations, the medical literature generally considers positive samples showing a concentration of HBc IgM ≥ 10 PEI U/ml.

Test results are therefore interpreted as a ratio of the sample OD450nm and the OD450nm/620-630nm of the Cal 10 PEI U/ml (or S/Co) according to the following table:

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

Q.2 Quantitative results

The calibration curve is used to determine the concentration of IgM antibodies to HBcAg in samples.

Samples with a concentration lower than 5 PEI U/ml are considered negative for HBcIgM.

Samples with a concentration between 5 and 10 PEI U/ml are considered in a gray-zone.

In the follow up of chronic hepatitis, however, values higher of 5 PEI U/ml may be considered positive for HBcIgM, when in presence of other clinical signs.

Samples with a concentration higher than 10 PEI U/ml are considered positive for HBcIgM.

Important general notes:

- When the calculation of results is performed by the operating system of an ELISA automated work station, ensure that the proper formulation is used to produce the calibration curve, calculate sample concentration and generate the correct interpretation of results.
- Interpretation of results should be done under the supervision of the laboratory supervisor to reduce the risk of judgement errors and misinterpretations.
- A positive result is indicative of HBV infection and therefore the patient should be treated accordingly.
- When test results are transmitted from the laboratory to another facility, attention must be paid to avoid erroneous data transfer.
- Diagnosis of viral hepatitis infection has to be taken by and released to the patient by a suitably qualified medical doctor.

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).

1. Limit of detection

The limit of detection of the assay has been calculated by means of :

- the HBcIgM reference preparation supplied by Paul Erlich Institute, Germany (HBc-Referenzserum-IgM 84), on which the Standard Curve has been calibrated.
- Accurun 113 (cat. N° A113-5001) supplied by Boston Biomedica Inc., USA

Results of Quality Control for three lots are given in the following tables:

BCM.CE	Lot #	0103	Lot #	0103/2	Lot #	0303
PEI U/ml	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
100	2.752	8.9	2.883	9.7	2.911	9.1
50	1.917	6.2	1.972	6.7	2.053	6.4
20	0.980	3.2	0.914	3.1	1.095	3.4
10	0.544	1.8	0.513	1.7	0.592	1.8
5	0.310	1.0	0.296	1.0	0.321	1.0
2.5	0.155	0.5	0.149	0.5	0.161	0.5
1.25	0.084	0.3	0.084	0.3	0.093	0.3
negative	0.040		0.035		0.044	

BBI Accurun # 113 lot # 48-9999-0621

BCM.CE	Lot #	0103	Lot #	0103/2	Lot #	0303
BBI 113	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1 x	3.336	10.8	3.195	10.4	3.269	10.3
2 x	2.472	8.0	2.385	7.8	2.385	7.5
4 x	1.467	4.7	1.413	4.6	1.429	4.5
8 x	0.865	2.8	0.807	2.6	0.856	2.7
16 x	0.430	1.4	0.427	1.4	0.410	1.3
32 x	0.234	0.8	0.234	0.8	0.248	0.8
64 x	0.129	0.4	0.133	0.4	0.122	0.4
128 x	0.086	0.3	0.082	0.3	0.089	0.3
negative	0.040		0.040		0.052	

Moreover the BBI's panel # PHE 102 was also examined in three lots of product; data are reported below with reference to a European kit (BBI's results).

BBI – Panel code PHE 102

	Lot # 0103	Lot # 0103/2	Lot # 0303	Sorin EIA
Member	S/Co	S/Co	S/Co	S/Co
01	6.7	6.3	6.5	2.0
02	11.3	10.0	10.7	6.1
03	9.5	7.2	8.4	3.0
04	5.8	3.4	4.1	2.1
05	11.3	11.4	11.2	3.1
06	12.1	11.6	11.8	4.1
07	0.1	0.1	0.1	0.2
08	9.2	8.5	8.8	2.3
09	12.2	11.7	11.9	4.2
10	11.7	10.2	10.8	2.8
11	5.9	5.8	5.8	2.1
12	12.7	11.4	11.7	5.2
13	11.6	11.0	11.3	3.6
14	7.0	6.3	6.6	2.3
15	12.4	11.5	11.8	4.5

2. Diagnostic Sensitivity:

It is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

The diagnostic sensitivity has been tested internally and externally in a qualified Clinical Laboratory on panels of samples classified positive by a US FDA approved kit.

Positive samples were collected from different patients and from different HBV pathologies (acute and chronic hepatitis).

An overall value > 98% has been found in the study conducted on a total number of more than 200 samples.

A Seroconversion panel produced by BBI, USA, code # PHM 935A, has also been studied; results are reported below with reference to two commercial kits (BBI's results).

BBI Panel PHM 935A

	Lot # 0103	Abbott EIA	DiaSorin EIA
Member #	S/Co	S/Co	S/Co
01	0.2	0.1	0.1
02	0.2	0.1	0.1
03	0.2	0.1	0.1
04	0.1	0.1	0.1
05	0.2	0.1	0.1
06	0.2	0.1	0.1
07	0.2	0.1	0.1
08	0.1	0.1	0.1
09	0.1	0.1	0.1
10	0.1	0.1	0.1
11	0.2	0.1	0.1
12	0.2	0.1	0.1
13	2.8	3.7	0.7
14	5.0	6.4	0.9
15	> 12	6.2	4.5
16	> 12	5.6	4.5
17	> 12	5.5	4.3
18	> 12	4.8	4.3
19	> 12	> 6.6	4.4
20	> 12	> 6.6	5.2

3. Diagnostic Specificity:

It is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

The diagnostic specificity has been determined internally and externally in a qualified Clinical Laboratory on panels of negative samples from normal individuals and blood donors, classified negative with a US FDA approved kit.

A total number of more than 400 negative specimens were tested. A diagnostic specificity > 98% has been found.

Moreover, the diagnostic specificity was assessed by testing more than 50 potentially interfering specimens (other infectious diseases, patients affected by non viral hepatic diseases, dialysis patients, pregnant women, hemolyzed, lipemic, etc.).

No interference was observed in the study.

Both plasma, derived with different standard techniques of preparation (citrate, EDTA and heparin), and sera have been

used to determine the specificity. No false reactivity due to the method of specimen preparation has been observed.

Frozen specimens have also been tested to check whether this interferes with the performance of the test. No interference was observed on clean and particle free samples.

4. Precision:

It has been calculated on three samples examined in 16 replicate in three different runs, carried out on three different lots. The values found were as follows:

BCM.CE: lot # 0103

Cal 0 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.055	0.053	0.051	0.053
Std.Deviation	0.005	0.006	0.005	0.006
CV %	9.9	12.3	10.7	10.9

Cal 5 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.324	0.308	0.321	0.318
Std.Deviation	0.022	0.018	0.024	0.021
CV %	6.8	5.7	7.5	6.7

Cal 50 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.109	2.048	2.052	2.070
Std.Deviation	0.101	0.088	0.136	0.109
CV %	4.8	4.3	6.7	5.2

BCM.CE: lot # 0103/2

Cal 0 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.057	0.053	0.054	0.055
Std.Deviation	0.005	0.005	0.004	0.004
CV %	8.3	9.0	7.3	8.2

Cal 5 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.332	0.331	0.322	0.328
Std.Deviation	0.017	0.018	0.016	0.017
CV %	5.0	5.5	4.9	5.1

Cal 50 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.311	2.208	2.212	2.244
Std.Deviation	0.110	0.090	0.095	0.098
CV %	4.7	4.1	4.3	4.4

BCM.CE: lot # 0303

Cal 0 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.043	0.042	0.040	0.042
Std.Deviation	0.004	0.005	0.004	0.004
CV %	10.3	11.1	10.9	10.8

Cal 5 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	0.320	0.326	0.314	0.320
Std.Deviation	0.023	0.024	0.026	0.024
CV %	7.1	7.4	8.2	7.6

Cal 50 U/ml (N = 16)

Mean values	1st run	2nd run	3 rd run	Average value
OD 450nm	2.150	2.163	2.092	2.135
Std.Deviation	0.057	0.067	0.076	0.067
CV %	2.6	3.1	3.6	3.1

Important note:

The performance data have been obtained proceeding as the reading step described in the section M, point 12.

S. LIMITATIONS

Frozen samples containing fibrin particles or aggregates may generate false positive results.

Bacterial contamination or heat inactivation of the specimen may affect the absorbance values of the samples with consequent alteration of the level of the analyte.

This test is suitable only for testing single samples and not pooled ones.

Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. The patient's clinical history, symptomatology, as well as other diagnostic data should be considered.

REFERENCES

1. Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
2. Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
3. Remington J.S. and Klein J.O.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
4. Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
5. Snyderman D.R., Bryan J.A. and Dixon R.E.. Ann.Int.Med., 83, pp 838, 1975.
6. Barker L.F., Gerety R.J., Lorenz D.E.. Viral Hepatitis. 581-587, 1978.
7. Cossart Y.. Brit.Med.Bull.. 28, pp 156, 1972
8. Lander J.J., Alter H. and Purcell R.. J.Immunol.. 106, pp 1066, 1971
9. Mushawar I.K., Dienstag J.L., Polesky H.F. et al.. Ann.J.Clin.Pathol.. 76, pp 773, 1981.
10. Grebenchtchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002
11. Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:

Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.

Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni (MI) – Italy



0318

HBc IgM

**Ensayo inmunoenzimático de “Captura”
(ELISA) para la determinación
cualitativa/cuantitativa de anticuerpos clase
IgM al Antígeno core del virus de la
Hepatitis B en plasma y suero humanos**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro”-



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF BCM.CE
96 pruebas

HBc IgM

A. OBJETIVO DEL EQUIPO.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación cualitativa/cuantitativa de anticuerpos clase IgM al Antígeno core del virus de la Hepatitis B (HBV) en plasma y suero humanos mediante el sistema de "Captura".

El equipo ha sido diseñado para la clasificación del agente viral y para el seguimiento de pacientes crónicos sometidos a terapia.

Uso exclusivo para diagnóstico "in vitro".

B. INTRODUCCIÓN.

El antígeno core del virus de la Hepatitis B (HBcAg) es el elemento principal de las partículas del núcleo del virus.

Las partículas tienen un tamaño de 27nm y contienen una molécula de ADN circular de doble cadena, una ADN polimerasa específica y HBcAg. El antígeno del core está compuesto por un polipéptido simple de 17 kD, el cual es liberado en el proceso de desagregación de la partícula viral. Este antígeno contiene al menos un determinante inmunogénico. Durante la infección primaria, los anticuerpos IgM anti-HBcAg, son unos de los primeros marcadores del HBV que aparecen en el suero, conjuntamente o ligeramente antes de que aparezca el antígeno de superficie (HBsAg).

Los títulos de anticuerpos IgM al HBcAg, bastante altos durante la fase aguda, descienden en el transcurso de la enfermedad hasta alcanzar niveles no detectables en pacientes convalescientes. Sin embargo, en el caso de la hepatitis crónica, se aprecian picos de anticuerpos IgM anti-HBcAg, lo cual confirma la reactivación del virus en los hepatocitos y origina bajos títulos permanentes de IgM.

La determinación de anticuerpos IgM anti-HBcAg es de gran importancia para la rápida clasificación del virus, de las fases de la enfermedad, así como para el seguimiento de pacientes sometidos a tratamiento con interferón.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO.

El ensayo se basa en el principio de "captura de IgM" donde esta clase de anticuerpos, si están presentes en la muestra, quedan capturados por la fase sólida, recubierta por anticuerpos anti-IgM humanos.

Después del lavado, mediante el cual se eliminan los restantes componentes de la muestra fundamentalmente los anticuerpos IgG, se detectan los anticuerpos IgM unidos a la fase sólida mediante la adición de una preparación de HBcAg recombinante purificada, marcada con un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa (HRP).

Después de la incubación y previo lavado, se añade la mezcla cromógeno/substrato, la cual se combina con la enzima conjugada unida a la fase sólida. El substrato es hidrolizado, en presencia de peroxidasa, a un producto coloreado final cuya densidad óptica es detectable y es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM al HBcAg presentes en la muestra.

D. COMPONENTES

Cada equipo contiene reactivos suficientes para realizar 96 pruebas.

1. Microplaca: MICROPLATE

8x12 tiras de pocillos recubiertos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgM humano, post-recubiertos con proteínas del suero bovino y almacenados en bolsas selladas con desecante. Se deben poner las placas a temperatura ambiente antes de abrirlas, sellar las tiras sobrantes en la bolsa con el desecante y almacenar a 4°C.

2. Curva de Calibración: CAL N° ...

6x2.0 ml/vial. Listo para el uso y curva estándar con código de color, calibrada a partir de una preparación de HBcIgM de referencia, suministrada por el Instituto Paul Erlich (HBc-Referenzserum-IgM 84), con rangos: CAL1 = 0 U/ml // CAL2 = 5 U/ml // CAL3 = 10 U/ml // CAL4 = 20 U/ml // CAL 5 = 50 U/ml // CAL 6 = 100 U/ml. Contiene plasma humano HBcIgM positivo sometido a inactivación química, tampón Tris 100 mM pH 7.4+/- 0.1, 0.5% de Tween 20, así como azida sódica 0.09% y ProClin 300 0.045% como conservantes. La Curva de Calibración está codificada con el color azul.

Nota importante: Aunque el plasma esté inactivado por métodos químicos, se debe manipular como potencialmente infeccioso.

3. Tampón de Lavado Concentrado: WASHBUF 20X

1x60ml/botella. Solución concentrada 20x.

Una vez diluida, la solución de lavado contiene tampón fosfato 10mM a pH 7.0+/- 0.1, Tween 20 al 0.05% y ProClin 300 al 0.045%.

4. Conjugado (Inmunocomplejo) : CONJ

1x16.0 ml/vial. Solución lista para el uso. Contiene un Inmunocomplejo formado por un anticuerpo monoclonal de ratón marcado con HRP y HBcAg recombinante purificado. El reactivo está disuelto en tampón Tris 10 mM pH 6.8+/-0.1, BSA 2%, además de sulfato de gentamicina 0.2 % y ProClin 300 0.045% como conservantes. El reactivo está codificado con el color rojo.

5. Diluyente de muestras : DILSPE

2x60.0 ml/vial. Solución tamponada para disolver las muestras. Contiene tampón Tris 100 mM pH 7.4 +/- 0.1, 0.5% de Tween 20, caseína al 2%, 0.045% de ProClin 300 y azida sódica al 0.09% como conservantes. El reactivo está codificado con el color azul.

6. Suero Control: CONTROL ...ml

1 vial. Liofilizado.

Contiene suero bovino fetal, plasma humano positivo a HBcIgM, concentrado a 20 ±10% PEI U/ml, 0.2 mg/ml de sulfato de gentamicina y ProClin 300 0.045% como conservantes.

Notas importantes:

1. El volumen necesario para disolver el contenido del vial varía en cada lote. Se recomienda usar el volumen correcto reportado en la etiqueta.

2. Aunque el plasma esté inactivado por métodos químicos, se debe manipular como potencialmente infeccioso.

7. Cromógeno/Substrato. SUBS TMB

1x16ml/vial. Contiene una solución tamponada citrato-fosfato 50 mM pH 3.5-3.8, dimetilsulfóxido 4%, tetra-metil-benzidina (TMB) 0.03% y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 0.02%.

Nota: Evitar la exposición a la luz, ya que la sustancia es fotosensible.

8. Ácido Sulfúrico: H₂SO₄ 0.3 M

1x15ml/vial. Contiene solución de H₂SO₄ 0.3M

Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

9. Sellador adhesivo, n° 2

10. Manual de instrucciones, n° 1

E. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS.

1. Micropipetas calibradas (150µl, 100µl y 50µl) y puntas plásticas desechables.
2. Agua de calidad EIA (bidestilada o desionizada, tratada con carbón para remover químicos oxidantes usados como desinfectantes).
3. *Timer* con un rango de 60 minutos como mínimo.
4. Papel absorbente.
5. Incubador termostático de microplacas ELISA, calibrado (en seco o húmedo) fijo a 37°C (tolerancia+/-1°C).
6. Lector calibrado de microplacas de ELISA con filtros de 450nm (lectura) y de 620-630 nm.
7. Lavador calibrado de microplacas ELISA.
8. Vórtex o similar.

F. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.

1. El equipo debe ser usado por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un doctor responsable del laboratorio.
2. Todas las personas encargadas de la realización de las pruebas deben llevar las ropas protectoras adecuadas de laboratorio, guantes y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (aguja). El personal debe ser adiestrado en procedimientos de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
3. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra HBV y HAV, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
4. Se debe controlar el ambiente del laboratorio para evitar la contaminación de los componentes con polvo o agentes microbianos cuando se abran los equipos, así como durante la realización del ensayo. Evitar la exposición del sustrato a la luz y las vibraciones de la mesa de trabajo durante el ensayo.
5. Conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en cámara fría.
6. No intercambiar reactivos de diferentes lotes ni tampoco de diferentes equipos.
7. Comprobar que los reactivos no contienen precipitados ni agregados en el momento del uso. De darse el caso, informar al responsable para realizar el procedimiento pertinente.
8. Evitar contaminación cruzada entre muestras de suero/plasma usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
9. Evitar contaminación cruzada entre los reactivos del equipo usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso. No reutilizar puntas desechables.
10. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en el equipo e internamente en los reactivos.
11. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de suero humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed.1984.
12. Se recomienda el uso de material plástico desechable para la preparación de las soluciones de lavado y para la transferencia de los reactivos a los diferentes equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones.
13. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben de ser eliminados según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos provenientes del proceso de lavado deben ser tratados como potencialmente infecciosos y deben ser inactivados. Se recomienda la

inactivación con lejía al 10% de 16 a 18 horas o el uso de la autoclave a 121°C por 20 minutos.

14. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y posteriormente en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.
15. El ácido sulfúrico es irritante. En caso de derrame, se debe lavar la superficie con abundante agua.
16. Otros materiales de desecho generados durante la utilización del equipo (por ejemplo: puntas usadas en la manipulación de las muestras y controles, microplacas usadas) deben ser manipuladas como fuentes potenciales de infección de acuerdo a las directivas nacionales y leyes para el tratamiento de residuos de laboratorio.

G. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES.

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el suero o plasma según la técnica estándar de los laboratorios de análisis clínico. No se ha detectado que el tratamiento con citrato, EDTA o heparina afecte las muestras.
2. Evitar la adición de conservantes, especialmente azida sódica ya que puede afectar la actividad enzimática del conjugado, generando resultados falsos negativos.
3. Las muestras deben estar identificadas claramente mediante código de barras o nombres, a fin de evitar errores en los resultados.
4. Las muestras hemolizadas (color rojo) o hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben ser descartadas para evitar falsos resultados, al igual que aquellas donde se observe la presencia de precipitados, restos de fibrina o filamentos microbianos.
5. El suero y el plasma pueden conservarse a una temperatura entre +2° y +8°C en tubos de recolección principales hasta cinco días después de la extracción. No congelar tubos de recolección principales. Para periodos de almacenamiento más prolongados, las muestras de plasma o suero, retiradas cuidadosamente del tubo de extracción principal, pueden almacenarse congeladas a -20°C durante al menos 12 meses. Evitar congelar/descongelar cada muestra más de una vez, ya que pueden generarse partículas que podrían afectar al resultado de la prueba.
6. Si hay presencia de agregados, la muestra se puede aclarar mediante centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos o por filtración con un filtro de 0,2-0,8 micras.

H. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES.

Según estudios realizados, no se ha detectado pérdida relevante de actividad en equipos utilizados hasta 6 veces, durante un período de hasta 3 meses.

Microplacas:

Dejar la microplaca a temperatura ambiente (aprox. 1 hora) antes de abrir el envase. Compruebe que el desecante no esté de un color verde oscuro, lo que indicaría un defecto de fabricación. De ser así, debe solicitar el servicio de Dia.Pro: Atención al cliente.

Las tiras de pocillos no utilizadas, deben guardarse herméticamente cerradas en la bolsa de aluminio con el desecante a 2-8°C. Una vez abierto el envase, las tiras sobrantes, se mantienen estables hasta que el indicador de humedad dentro de la bolsa del desecante cambie de amarillo a verde.

Curva de Calibración:

Listo para el uso. Mezclar bien con la ayuda de un vórtex, antes de usar.

Solución de Lavado Concentrada:

Todo el contenido de la solución concentrada 20x debe diluirse con agua bidestilada hasta alcanzar 1200ml y mezclarse suavemente antes de usarse. Durante la preparación evitar la formación de espuma y burbujas, lo que podría influir en la eficiencia de los ciclos de lavado.

Nota: Una vez diluida, la solución es estable por una semana a temperaturas entre +2 y 8°C.

Conjugado:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Diluyente de muestras :

Solución lista para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

Suero Control:

Añadir al polvo liofilizado el volumen de agua de calidad ELISA indicado en la etiqueta. Dejar disolver totalmente y mezclar suavemente en el vórtex. El suero disuelto está listo para el uso.

Nota: Una vez reconstituida, la solución no es estable. Se recomienda mantenerla congelada en alícuotas a -20°C.

Cromógeno/ Substrato:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar. Evitar posible contaminación del líquido con oxidantes químicos, polvo o microbios. Evitar la exposición a la luz, agentes oxidantes y superficies metálicas. En caso de que deba transferirse el reactivo, usar contenedores de plástico, estériles y desechables, siempre que sea posible.

Ácido Sulfúrico:

Listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.
Atención: Irritante (H315, H319; P280, P302+P352, P332+P313, P305+P351+P338, P337+P313, P362+P363).

Leyenda:

Indicación de peligro, Frases H

H315 – Provoca irritación cutánea.

H319 – Provoca irritación ocular grave.

Consejo de prudencia, Frases P

P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352 – EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P332 + P313 – En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

P305 + P351 + P338 – EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P337 + P313 – Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

P362 + P363 – Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

I. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO.

1. Las micropipetas deben ser calibradas para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y sometidas a una descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (etanol 70%, lejía 10%, de calidad de los desinfectantes hospitalarios). Deben además, ser

regularmente revisadas para mantener una precisión del 1% y una confiabilidad de +/- 2%.

2. La incubadora de ELISA debe ser ajustada a 37°C (+/- 0.5°C) y controlada periódicamente para mantener la temperatura correcta. Pueden emplearse incubadoras secas o baños de agua siempre que estén validados para la incubación de pruebas de ELISA.
3. El lavador ELISA es extremadamente importante para el rendimiento global del ensayo. El lavador debe ser validado de forma minuciosa previamente, revisado para comprobar que suministra el volumen de dispensación correcto y enviado regularmente a mantenimiento de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. En particular, deben lavarse minuciosamente las sales con agua desionizada del lavador al final de la carga de trabajo diaria. Antes del uso, debe suministrarse extensivamente solución de lavado diluida al lavador. Debe enviarse el instrumento semanalmente a descontaminación según se indica en su manual (se recomienda descontaminación con NaOH 0.1 M). Para asegurar que el ensayo se realiza conforme a los rendimientos declarados, basta con 5 ciclos de lavado (aspiración + dispensado de 350 µl/pocillo de solución de lavado + 20 segundos de remojo = 1 ciclo). Si no es posible remojar, añadir un ciclo de lavado adicional. Un ciclo de lavado incorrecto o agujas obstruidas con sal son las principales causas de falsas reacciones positivas.
4. Los tiempos de incubación deben tener un margen de ±5%.
5. El lector de microplacas ELISA debe estar provisto de un filtro de lectura de 450nm y de un segundo filtro de 620-630nm, obligatorio para reducir interferencias en la lectura. El procedimiento estándar debe contemplar: a) Ancho de banda <= 10 b) Rango de absorbancia de 0 a >=2.0, c) Linealidad >=2.0, reproducibilidad >=1%. El blanco se prueba en el pocillo indicado en la sección "Procedimiento del ensayo". El sistema óptico del lector debe ser calibrado periódicamente para garantizar la correcta medición de la densidad óptica, según las normas del fabricante.
6. En caso de usar un sistema automatizado de ELISA, los pasos críticos (dispensado, incubación, lavado, lectura, agitación y procesamiento de datos) deben ser cuidadosamente fijados, calibrados, controlados y periódicamente ajustados, para garantizar los valores indicados en las secciones "Control interno de calidad" y "Procedimiento del ensayo". El protocolo del ensayo debe ser instalado en el sistema operativo de la unidad y validado tanto para el lavador como para el lector. Por otro lado, la parte del sistema que maneja los líquidos (dispensado y lavado) debe ser validada y fijada correctamente. Debe prestarse particular atención a evitar el arrastre por las agujas de dispensación y las de lavado, a fin de minimizar la posibilidad de ocurrencia de falsos positivos por contaminación de los pocillos adyacentes por muestras fuertemente reactivas. Se recomienda el uso de sistemas automatizados para el pesquaje en unidades de sangre y cuando la cantidad de muestras supera las 20-30 unidades por ensayo.
7. El servicio de atención al cliente en Dia.Pro, ofrece apoyo al usuario para calibrar, ajustar e instalar los equipos e instrumentos a usar en combinación con el equipo, con el propósito de asegurar el cumplimiento de los requerimientos descritos.

L. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO.

1. Compruebe la fecha de caducidad indicada en la parte externa del equipo (envase primario). No usar si ha caducado.
2. Compruebe que los componentes líquidos no están contaminados con partículas o agregados visibles. Asegúrese de que el cromógeno (TMB) es incoloro o azul pálido, aspirando un pequeño volumen de este con una pipeta estéril de plástico. Compruebe que no han ocurrido rupturas ni derrames de líquido dentro de la caja (envase

primario) durante el transporte. Asegurarse de que la bolsa de aluminio que contiene la microplaca no esté rota o dañada.

3. Diluir totalmente la Solución de Lavado Concentrada 20X, como se ha descrito anteriormente y mezclar suavemente.
4. Disolver el Suero Control como se ha descrito anteriormente.
5. Dejar los componentes restantes alcanzar la temperatura ambiente (aprox. 1 hora), mezclar después suavemente en el vórtex todos los reactivos líquidos.
6. Ajustar la incubadora de ELISA a 37°C y cebar el lavador de ELISA utilizando la solución de lavado, según las instrucciones del fabricante. Fijar el número de ciclos de lavado según se indica en la sección específica.
7. Comprobar que el lector de ELISA esté encendido al menos 20 minutos antes de realizar la lectura.
8. En caso de trabajar automáticamente, encender el equipo y comprobar que los protocolos estén correctamente programados.
9. Comprobar que las micropipetas estén fijadas en el volumen requerido.
10. Asegurarse de que el equipamiento a usar esté en perfecto estado, disponible y listo para el uso.

En caso de surgir algún problema, se debe detener el ensayo y avisar al responsable.

M. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

El ensayo debe realizarse según las instrucciones que siguen a continuación, es importante mantener en todas las muestras el mismo tiempo de incubación.

Pueden realizarse dos procedimientos acorde a los requerimientos del clínico.

M.1 Análisis Cuantitativo

1. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares.
2. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores y el Suero Control disuelto ya que están listos para el uso.
3. Dejar los pocillos A1 y B1 vacíos para el blanco.
4. Dispensar 100µl de los Calibradores por duplicado, 100µl del Suero Control disuelto por duplicado y después 100µl de las muestras diluidas. El Suero Control se emplea para verificar que el sistema analítico funcione como es debido. Comprobar que el Suero Control, los Calibradores y las muestras han sido añadidos adecuadamente.
5. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace la prueba manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

6. Después de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
7. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1 y B1, controlar que los reactivos han sido correctamente añadidos. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta y no sumergir la parte superior de la misma en los controles o muestras. Podría producirse contaminación.

8. Después de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
9. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluidos los del blanco.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario se generan interferencias.

10. Incubar la microplaca, protegida de la luz, durante **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color claro a azul.
11. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición de la Solución de parada cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm (lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con los pocillos A1 y B1 (blanco).

M.2 Análisis Cualitativo

1. Poner el número necesario de tiras en el soporte plástico e identificar los pocillos de las muestras y de los estándares.
2. Diluir las muestras **1:101** dispensando en un tubo desechable 1 ml de Diluyente de Muestras y 10 µl de muestra, mezclar con ayuda de un vórtex, antes de usar. No diluir los Calibradores disuelto ya que están listos para el uso.
3. Dejar el pocillo A1 vacío para el blanco.
4. Dispensar 100 µl del Calibrador 0 U/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 10 U/ml por duplicado, 100 µl del Calibrador 100 U/ml simple. Dispensar después 100 µl de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes. Comprobar que el Suero Control, los Calibradores y las muestras han sido añadidos adecuadamente.
5. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Las tiras se deben sellar con el adhesivo suministrado solo cuando se hace la prueba manualmente. No sellar cuando se emplean equipos automatizados de ELISA.

6. Después de la primera incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
7. Dispensar 100µl de Conjugado en todos los pocillos, excepto A1. Incubar la microplaca durante **60 minutos a +37°C**.

Nota importante: Tener cuidado de no tocar la pared interna del pocillo con la punta de la pipeta y no sumergir la parte superior de la misma en los controles o muestras. Podría producirse contaminación.

8. Después de la segunda incubación, lavar los pocillos según lo descrito previamente (sección I.3).
9. Dispensar 100µl de Cromógeno/Substrato en todos los pocillos, incluido el A1.

Nota importante: No exponer directamente a fuerte iluminación, de lo contrario pudieran generarse interferencias.

10. Incubar la microplaca, protegida de la luz, durante **20 minutos a temperatura ambiente (18-24°C)**. Los pocillos correspondientes a las muestras positivas, el Suero Control y los Calibradores positivos deben cambiar de color claro a azul.
11. Dispensar 100µl de ácido sulfúrico en todos los pocillos para detener la reacción enzimática, usar la misma secuencia que en el paso 9. La adición de la Solución de parada cambia el color del control positivo y las muestras positivas de azul a amarillo.
12. Medir la intensidad del color con el lector, según se describe en la sección I.5, utilizando un filtro de 450 nm

(lectura) y otro de 620-630 nm (substracción del fondo, obligatorio), calibrando el instrumento con el pocillo A1.

Notas generales importantes:

1. Asegurarse de que no hay impresiones digitales en el fondo de los pocillos antes de leer. Podrían generarse falsos positivos en la lectura.
2. La lectura debe hacerse inmediatamente después de añadir la solución de parada y, en cualquier caso, nunca transcurridos 20 minutos después de su adición. Se podría producir auto oxidación del cromógeno causando un elevado fondo.
3. El suero de control (CS) no afecta al cálculo del valor de corte y, por lo tanto, no afecta al cálculo de los resultados de la prueba. El suero de control (CS) se usa solo si la gestión requiere un control interno de calidad del laboratorio.

N. ESQUEMA DEL ENSAYO

El protocolo del ensayo se resume en la siguiente tabla:

Calibradores & Muestras diluidas & Suero Control Disuelto	100 µl
1ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavados	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Conjugado	100 µl
2ª incubación	60 min
Temperatura	+37°C
Lavados	n° 5 cycles with 20" of soaking OR n° 6 cycles without soaking
Cromógeno/Substrato	100µl
3ª incubación	20 min
Temperatura	t.a.*
Acido Sulfúrico	100 µl
Lectura D.O.	450nm / 620-630nm

t.a.*temperatura ambiente

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cuantitativo:

		Microplaca											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	CAL4	M1										
B	BL	CAL4	M2										
C	CAL1	CAL5	M3										
D	CAL1	CAL5	M4										
E	CAL2	CAL6	M5										
F	CAL2	CAL6	M6										
G	CAL3	SC	M7										
H	CAL3	SC	M8										

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // SC= Suero Control // M = Muestra

A continuación se describe un ejemplo del esquema de dispensado en el análisis cualitativo:

Microplaca

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M3	M11										
B	CAL1	M4	M12										
C	CAL1	M5	M13										
D	CAL3	M6	M14										
E	CAL3	M7	M15										
F	CAL6	M8	M16										
G	M1	M9	M17										
H	M2	M10	M18										

Leyenda: BL = Blanco // CAL = Calibradores // M = Muestra

O. CONTROL DE CALIDAD INTERNO.

Se realiza un grupo de pruebas con los controles cada vez que se usa el equipo para verificar si el procedimiento durante el ensayo se ha realizado correctamente.

Asegurar el cumplimiento de los siguientes parámetros:

Parámetro	Exigencia
Pocillo Blanco	< 0.100 DO450nm
Calibrador 0 PEI U/ml	< 0.150 DO450nm después de leer el blanco
Coeficiente de variación	< 30%
Calibrador 5 PEI U/ml	DO450nm > DO450nm Cal 0 U/ml + 5DS y > DO450nm Cal 0 U/ml + 0.100
Calibrador 10 PEI U/ml	DO450nm > DO450nm Cal 0 U/ml + 0.200
Calibrador 100 PEI U/ml	> 1.000 DO450nm
Suero Control	DO450nm = DO450nm Calibrador 20 U/ml +/-10%

Si los resultados del ensayo coinciden con lo establecido anteriormente, pase a la siguiente sección.

En caso contrario, detenga el ensayo y compruebe:

Problema	Compruebe que
Pocillo blanco > 0.100DO450nm	la solución cromógeno/substrato no se ha contaminado durante el ensayo.
Calibrador 0 U/ml > 0.150 DO 450nm después de leer el blanco Coeficiente de variación > 30%	<ol style="list-style-type: none"> 1. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 2. se ha usado la solución de lavado apropiada y que el lavador ha sido cebado con la misma antes del uso. 3. no se han cometido errores en el procedimiento del ensayo (dispensado de un Calibrador positivo en lugar del Cal 0) 4. no ha existido contaminación del Cal 0 o de sus pocillos debido a muestras positivas derramadas, o al conjugado. 5. las micropipetas no se han contaminado con muestras positivas o con el conjugado. 6. las agujas del lavador no estén parcial o totalmente obstruidas.

Calibrador 5 U/ml < CAL 0 + 5 DS or < CAL 0 + 0.100	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Calibrador 10 U/ml < CAL 0 + 0.200	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar el calibrador equivocado). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.
Calibrador 100 U/ml < 1.000 DO 450nm	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución. 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador estén validados según los estudios previos de calificación. 4. no ha ocurrido contaminación externa del calibrador.

Suero Control Valor distinto al esperado	1. el procedimiento ha sido realizado correctamente. 2. no ha habido errores durante su distribución (dispensar una muestra equivocada). 3. el proceso de lavado y los parámetros del lavador son correctos. 4. no ha ocurrido contaminación externa de los controles. 5. el Suero Control ha sido disuelto con el volumen correcto indicado en la etiqueta Si se indica un error, el ensayo debe repetirse tras eliminar la causa del mismo. En caso de no encontrar un error, procedase como sigue: a) si se obtiene un valor hasta +/-20%: la precisión global del laboratorio podría no permitir alcanzar +/-10% del valor esperado. Comunicar el problema al responsable para aceptar ó rechazar este resultado. b) si se obtiene un valor superior a +/-20%: en este caso el test es inválido y hay que avisar al servicio de atención al cliente de DiaPro
--	--

Si se presenta alguno de los problemas anteriores, avisar al responsable para tomar las medidas pertinentes.

Nota importante:

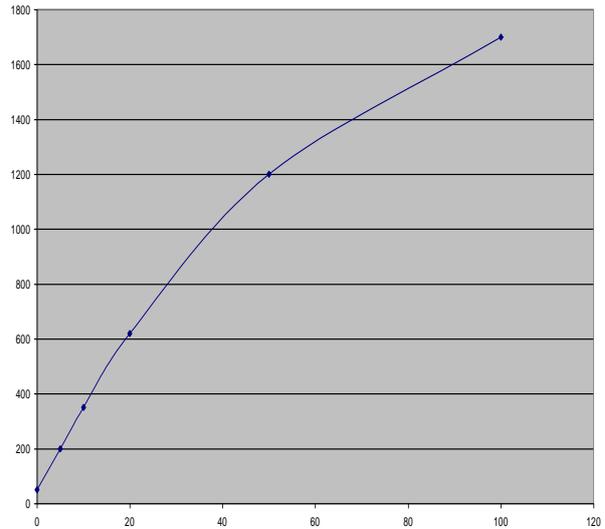
El análisis debe seguir el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

P. RESULTADOS.

P.1 Método cuantitativo.

Si el ensayo resulta válido, usar para el método cuantitativo un programa de ajuste de curva para diseñar la curva de calibración con los valores obtenidos en la lectura a 450nm/620-630nm (se sugiere interpolar 4 parámetros). Después calcular sobre la curva de calibración la concentración de anticuerpos IgM anti-HBc presentes en la muestra.

A continuación, un ejemplo de curva de calibración:



Nota Importante:

No usar la curva anterior para formular los cálculos.

P.2 Método cualitativo.

En el método cualitativo, calcular los valores medios de DO450nm/620-630nm para los Calibradores 0 y 10 U/ml, después comprobar que el ensayo es válido.

A continuación, un ejemplo de los cálculos a realizar (datos obtenidos siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12):

Los siguientes datos no deben usarse en lugar de los valores reales obtenidos en el laboratorio.

Calibrador 0 U/ml: 0.020 – 0.024 DO 450nm
 Valor medio: 0.022 DO 450nm
 Menor de 0.150 – Válido

Calibrador 10 U/ml: 0.350 – 0.330 DO 450nm
 Valor medio: 0.340 DO 450nm
 Mayor de Cal 0 + 0.200 – Válido

Calibrador 100 U/ml: 2.845 DO 450nm
 Mayor de 1.000 – Válido

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Q.1 Resultados cualitativos:

Para el método cualitativo, la literatura médica generalmente considera positivas aquellas muestras con una concentración de HBc IgM ≥ 10 PEI U/ml.

Los resultados se interpretan como la razón entre la DO 450nm /620-630nm de la muestra y la DO 450nm del Cal 10 PEI U/ml (M/Co), como se indica en la tabla:

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

Q.2 Resultados Cuantitativos:

La Curva de Calibración se emplea para determinar la concentración de anticuerpos IgM anti-HBcAg, presentes en la muestra.

Las muestras con una concentración menor de 5 PEI U/ml se consideran negativas a HBcIgM.

Las muestras con una concentración entre 5 y 10 PEI U/ml se consideran en la zona gris.

En el seguimiento de hepatitis crónica, sin embargo, valores superiores a 5 PEI U/ml pueden considerarse positivos a HBcIgM si están presentes otros signos clínicos. Las muestras con una concentración mayor de 10 PEI U/ml se consideran positivas a HBcIgM.

Notas generales importantes:

1. Cuando el cálculo de los resultados se halla mediante el sistema operativo de un equipo de ELISA automático, asegurarse de que la formulación usada para el cálculo del valor de corte, y para la interpretación de los resultados sea correcta.
2. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la vigilancia del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio y de interpretación.
3. Un resultado positivo indica infección por HBV por lo tanto el paciente debe ser tratado adecuadamente.
4. Cuando se transmiten los resultados de la prueba, del laboratorio a otras instalaciones, debe ponerse mucha atención para evitar el traslado de datos erróneos.
5. El diagnóstico de infección con un virus de la hepatitis debe ser evaluado y comunicado al paciente por un médico calificado.

R. FUNCIONAMIENTO

La evaluación del funcionamiento ha sido realizada según lo reportado en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (art. 5, Capítulo 3 de las Directivas IVD 98/79/EC).

1. Límite de detección.

El límite de detección del ensayo ha sido calculado por medio de:

- 1.3 La preparación de referencia para HBcIgM suministrada por el Instituto Paul Erlich, Alemania (HBc-Referenzserum-IgM 84), a partir de la cual se ha calibrado la Curva Estándar.
- 1.4 Accurun 113 (cat. N° A113-5001) suministrada por Boston Biomedica Inc., Estados Unidos.

La siguiente tabla muestra los resultados del Control de Calidad para tres lotes analizados:

BCM.CE	Lote #	0103	Lote #	0103/2	Lote #	0303
PEI U/ml	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co
100	2.752	8.9	2.883	9.7	2.911	9.1
50	1.917	6.2	1.972	6.7	2.053	6.4
20	0.980	3.2	0.914	3.1	1.095	3.4
10	0.544	1.8	0.513	1.7	0.592	1.8
5	0.310	1.0	0.296	1.0	0.321	1.0
2.5	0.155	0.5	0.149	0.5	0.161	0.5
1.25	0.084	0.3	0.084	0.3	0.093	0.3
Negativo	0.040		0.035		0.044	

BBI Accurun # 113

BCM.CE	Lote #	0103	Lote #	0103/2	Lote #	0303
BBI 113	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co	DO450nm	M/Co
1 x	3.336	10.8	3.195	10.4	3.269	10.3
2 x	2.472	8.0	2.385	7.8	2.385	7.5
4 x	1.467	4.7	1.413	4.6	1.429	4.5
8 x	0.865	2.8	0.807	2.6	0.856	2.7
16 x	0.430	1.4	0.427	1.4	0.410	1.3
32 x	0.234	0.8	0.234	0.8	0.248	0.8
64 x	0.129	0.4	0.133	0.4	0.122	0.4
128 x	0.086	0.3	0.082	0.3	0.089	0.3
Negativo	0.040		0.040		0.052	

Además se ha examinado el panel # PHE 102 de BBI en tres lotes del producto, los datos se reportan a continuación con referencia a un equipo europeo (resultados de BBI).

BBI - Panel código PHE 102

	Lote# 0103	Lote # 0103/2	Lote # 0303	Sorin EIA
Miembro	M/Co	M/Co	M/Co	M/Co
01	6.7	6.3	6.5	2.0
02	11.3	10.0	10.7	6.1

03	9.5	7.2	8.4	3.0
04	5.8	3.4	4.1	2.1
05	11.3	11.4	11.2	3.1
06	12.1	11.6	11.8	4.1
07	0.1	0.1	0.1	0.2
08	9.2	8.5	8.8	2.3
09	12.2	11.7	11.9	4.2
10	11.7	10.2	10.8	2.8
11	5.9	5.8	5.8	2.1
12	12.7	11.4	11.7	5.2
13	11.6	11.0	11.3	3.6
14	7.0	6.3	6.6	2.3
15	12.4	11.5	11.8	4.5

2. Sensibilidad Diagnóstica:

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar positivos en presencia del analito específico.

La sensibilidad diagnóstica ha sido probada interna y externamente en un Laboratorio Clínico calificado, a partir de paneles de muestras clasificadas como positivas según un equipo certificado US FDA.

Las muestras positivas se obtuvieron de diferentes pacientes y a partir de diversas patologías producidas por HBV (hepatitis aguda y crónica). En un estudio realizado a más de 200 muestras, se encontró un valor > 98%.

También se realizó un estudio con un panel de Seroconversión producido por BBI, Estados Unidos, código # PHM 935A cuyos resultados se reportan a continuación con referencia a dos equipos comerciales (resultados BBI).

BBI Panel PHM 935A

	Lote # 0103	Abbott EIA	DiaSorin EIA
Miembro#	M/Co	M/Co	M/Co
01	0.2	0.1	0.1
02	0.2	0.1	0.1
03	0.2	0.1	0.1
04	0.1	0.1	0.1
05	0.2	0.1	0.1
06	0.2	0.1	0.1
07	0.2	0.1	0.1
08	0.1	0.1	0.1
09	0.1	0.1	0.1
10	0.1	0.1	0.1
11	0.2	0.1	0.1
12	0.2	0.1	0.1
13	2.8	3.7	0.7
14	5.0	6.4	0.9
15	> 12	6.2	4.5
16	> 12	5.6	4.5
17	> 12	5.5	4.3
18	> 12	4.8	4.3
19	> 12	> 6.6	4.4
20	> 12	> 6.6	5.2

3. Especificidad Diagnóstica:

Se define como la probabilidad del ensayo de detectar negativos en ausencia del analito específico.

La especificidad diagnóstica ha sido determinada interna y externamente en un Laboratorio Clínico calificado, a partir de paneles de muestras provenientes de individuos sanos y donantes de sangre, las mismas fueron clasificadas como negativas según un equipo certificado US FDA.

Se examinaron más de 400 muestras negativas, la especificidad diagnóstica encontrada fue > 98%.

También se analizaron más de 50 muestras que pudieran provocar interferencia (por ejemplo: otras enfermedades infecciosas, pacientes afectados por hepatitis no virales, pacientes sometidos a diálisis, mujeres embarazadas, hemofílicos, lipémicos, etc.). No se observaron interferencias en el estudio.

Se emplearon además plasma sometido a métodos de tratamiento estándar (citrato, EDTA y heparina) y suero humanos. No se ha observado falsa reactividad debida a los métodos de tratamiento de muestras.

Las muestras congeladas han sido probadas para comprobar si la congelación interfiere con el procedimiento del ensayo. No se ha observado interferencia a partir de muestras limpias y libres de agregados.

4. Precisión:

Se realizó un estudio con 3 muestras, examinadas en 16 réplicas, en tres corridas separadas utilizando 3 lotes diferentes. Los valores obtenidos se reportan a continuación :

BCM.CE: lote # 0103

Cal 0 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.055	0.053	0.051	0.053
Desviación estándar	0.005	0.006	0.005	0.006
CV %	9.9	12.3	10.7	10.9

Cal 5 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.324	0.308	0.321	0.318
Desviación estándar	0.022	0.018	0.024	0.021
CV %	6.8	5.7	7.5	6.7

Cal 50 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	2.109	2.048	2.052	2.070
Desviación estándar	0.101	0.088	0.136	0.109
CV %	4.8	4.3	6.7	5.2

BCM.CE: lote # 0103/2

Cal 0 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.057	0.053	0.054	0.055
Desviación estándar	0.005	0.005	0.004	0.004
CV %	8.3	9.0	7.3	8.2

Cal 5 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.332	0.331	0.322	0.328
Desviación estándar	0.017	0.018	0.016	0.017
CV %	5.0	5.5	4.9	5.1

Cal 50 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	2.311	2.208	2.212	2.244
Desviación estándar	0.110	0.090	0.095	0.098
CV %	4.7	4.1	4.3	4.4

BCM.CE: lote # 0303

Cal 0 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.043	0.042	0.040	0.042
Desviación estándar	0.004	0.005	0.004	0.004
CV %	10.3	11.1	10.9	10.8

Cal 5 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	0.320	0.326	0.314	0.320
Desviación estándar	0.023	0.024	0.026	0.024
CV %	7.1	7.4	8.2	7.6

Cal 50 U/ml (N = 16)

Valores medios	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida	Valor Promedio
DO 450nm	2.150	2.163	2.092	2.135
Desviación estándar	0.057	0.067	0.076	0.067
CV %	2.6	3.1	3.6	3.1

Nota importante:

Los datos de rendimiento se obtuvieron siguiendo el paso de lectura descrito en la sección M, punto 12.

S. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

Las muestras que después de ser descongeladas presentan partículas de fibrina o partículas agregadas, generan algunos resultados falsos positivos.

La contaminación bacteriana de las muestras o la inactivación por calor pueden modificar los valores de absorbancia con la consiguiente alteración de los niveles del analito.

Este ensayo es adecuado solo para el análisis de muestras individuales y no para mezclas.

El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que es necesario tomar en consideración la historia clínica y la sintomatología del paciente así como otros datos diagnósticos.

BIBLIOGRAFÍA.

- Engvall E. and Perlmann P.. J. Immunochemistry, 8, 871-874, 1971
- Engvall E. and Perlmann P.. J.Immunol. 109, 129-135, 1971
- Remington J.S. and Klein J.O.. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A.. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed. pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto.
- Snydman D.R., Bryan J.A. and Dixon R.E.. Ann.Int.Med., 83, pp 838, 1975.
- Barker L.F., Gerety R.J., Lorenz D.E.. Viral Hepatitis. 581-587, 1978.
- Cossart Y.. Brit.Med.Bull.. 28, pp 156, 1972
- Lander J.J., Alter H. and Purcell R.. J.Immunol.. 106, pp 1066, 1971
- Mushawar I.K., Dienstag J.L., Polesky H.F. et al.. Ann.J.Clin.Pathol.. 76, pp 773, 1981.
- Grebentchikov N. et al.. J.Immunol. Methods, 15(2) :219-231, 2002
- Schrijver RS and Kramps JA, Rev.Sci.Tech. 17(2):550-561, 1998

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

Fabricante:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci n° 27 – Sesto San Giovanni
Milán – Italia


0318



- | | |
|--|---|
| EN: Kit component Safety Advisory list | IT: Elenco avvertenze di sicurezza per i componenti del kit |
| FR: Liste de sécurité consultative des composants de la trousse | DE: Liste der Sicherheitshinweise zu den Kitkomponenten |
| ES: Lista de referencia de seguridad de los componentes del kit | PT: Lista de advertências de segurança sobre os componentes do kit |
| RO: Lista cu Avertizări de siguranță referitoare la componentele trusei | NO: Sikkerhetsmeldingsliste for komponenter i settet |
| SV: Kit-komponent - Säkerhetsrådgivningslista | DA: Liste over råd vedr. sikkerhed for kitkomponent |
| CS: Poradní bezpečnostní list pro součásti soupravy | SK: Bezpečnostné pokyny pre zoznam komponentov súpravy |
| PL: Lista uwag dotyczących bezpieczeństwa dla składników zestawu | LV: Komplekta sastāvdaļu drošības ieteikumu saraksts |
| LT: Rinkinio komponentų saugos patarimų sąrašas | HU: Készletösszetevők biztonsági tanácsadó lista |
| BG: Препоръчителен списък за безопасност на компонентите на набора | TR: Kit bileşeni Güvenlik Tavsiye listesi |
| EL: Συμβουλευτική λίστα ασφαλείας συστατικών κιτ | RU: Справочный список по безопасности компонентов набора |
| ET: Komplekti komponendi ohutussuuniste loend | NL: Veiligheidsadvies kitonderdelen |
| FI: Pakkauksen osien turvallisuusohjeet | SL: Seznam varnostnih navodil za sestavne dele kompleta |
| ZH: 试剂盒组件安全咨询列表 | |

EN, NL: Product / IT: Prodotto / FR: Produit / DE, NO, SV, DA, PL: Produkt / ES: Producto / PT: Produto / RO: Produs / CS, SK: Výrobek / LV: Izstrādājums / LT: Preparatas / HU: Termék / BG: Продукт / TR: Ürün / EL: Προϊόν / RU: Изделие / ET: Toode / FI: Tuote / SL: Izdelek / ZH: 产品 :

REF N0164

SULFURIC ACID

EN: Components / IT: Componenti / FR: Composants / DE: Komponenten / ES, PT: Componentes / RO: Componente / SV, NO, DA: Komponenter / CS: Součásti / PL: Składniki / SK: Komponenty / LT: Komponentai / LV: Sastāvdaļas / BG: Компоненти / HU: Összetevők / EL: Συστατικά / TR: Bileşenler / ET: Komponendid / RU: Компоненты / FI: Osat / NL: Onderdelen / SL: Sestavni deli / ZH: 组件		MSDS EN, FR, DE, NL: Code / IT : Codice / RO: Cod / ES, PT: Código / NO, DA: kode / SV, CS, PL, SK, HU: Kod / LV: kods / LT: kodas / BG: код / TR: kodu / EL: Κωδικός / ET: kood / RU: Код/ FI: koodi / SL: koda / ZH: 规范
H_2SO_4	Blocking reagent	IMSDS62

#204.

PERFORMANCE EVALUATION KIT: PIPETTOR - WASHER

10 plates 204. Rinkinyje yra 10 plokštelių. **REF** 89894

30 plates **REF** 89897

KIT FOR THE EVALUATION OF PIPETTING SYSTEMS AND
MICROPLATE WASHERS USING A COLORIMETRIC METHOD



883529 - 2014/05

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

1. INTENDED USE	3
2. PRINCIPLE OF THE TEST	3
3. KIT COMPONENTS	4
4. PRECAUTIONS.....	4
5. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. PREPARATION OF REAGENTS	5
8. STORAGE CONDITIONS - SHELF LIFE.....	5
9. ASSAY PROCEDURE	5
10. RESULTS CALCULATION AND INTERPRETATION	5

1. INTENDED USE

The Pipettor-Washer Performance Evaluation kit is a colorimetric assay kit for the evaluation of precision and accuracy, of the volume dispensed by pipettor and microplate washer, and of the residual volume after aspiration by microplate washers.

To ensure conformity to original manufacturer's conditions and specifications, and to guarantee reliable operation, instruments used for *in-vitro* diagnostics testing must be evaluated at installation, and at regular intervals. Both accuracy and precision must be tested. Any variation from the expected value should lead to proper corrective actions until acceptable values are obtained.

The test passed/failed criteria, and the corrective action guide, both depend upon the equipment being tested, and are detailed within each equipment verification procedure.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The Pipettor - Washer Performance Evaluation kit consists of dye solutions specifically adapted to measure various liquid volume dispenses (10-300 μl) or residual volumes after aspiration (0-15 μl). The kit contains 3 empty bottles to be filled with clean water plus 16 bottles of dye (for 10 plate kit) or 21 bottles of dye (for 30 plate kit) with different concentrations of dye solution. The dye is chosen to conform to the Beer-Lambert law to a high degree over a wide dynamic range, and to be totally safe for the user and environment.

To test dispensing performance, the equipment dispenses the appropriate dye volume in a microplate. After the microplate wells have been thoroughly mixed, a microplate reader measures the absorbance value, and calculates the amount dispensed. To test aspirating performance, the equipment aspirates the content of a microplate previously filled with dye. Water is then added to the residual dye left in the wells. After mixing, the microplate reader measures the absorbance value of the resulting solution, and calculates the residual volume with reference to a linear curve which is derived from wells manually pipetted by a qualified technician. The statistics of the run can then be calculated.

204. Rinkiny's Performance Evaluation Kit Pipettor Washer yra skirtas pipetavimo ir plovimo procesų teisingumo ir tikslumo įvertinimui, galima naudoti, bet kokiai mikroplokštelių apdorojimo įrangai, jos parametrų įvertinimui t.y., apiima BEP200 ir Immunomat analizatorius

3. KIT COMPONENTS

All reagents are exclusively for *in vitro* diagnostic use.

Identification on label		Description	Quantity	
			89894	89897
	Microplate	Microplate Empty, Greiner 8 x 12 microplate	10 plates	30 plates
	Clean Water	Empty 15-ml Vial Empty vial. (To be filled with clean water)	3 vials (Empty)	3 vials (Empty)
C0	Color Solution C0	Color solution C0 Dye solution in Tris NaCl buffer containing Tween® 20 Preservative: ProClin 300 ($\leq 0.1\%$)	4 vials (14 ml)	9 vials (14 ml)
C1	Color Solution C1	Color solution C1 Dye solution in water Preservative: ProClin 300 ($\leq 0.1\%$)	3 vials (2 ml)	3 vials (2 ml)
C2	Color Solution C2	Color solution C2 Dye solution in water Preservative: ProClin 300 ($\leq 0.1\%$)	3 vials (2 ml)	3 vials (2 ml)
C3	Color Solution C3	Color solution C3 Dye solution in water Preservative: ProClin 300 ($\leq 0.1\%$)	3 vials (10 ml)	3 vials (10 ml)
C4	Color Solution C4	Color solution C4 Dye solution in water Preservative: ProClin 300 ($\leq 0.1\%$)	3 vials (10 ml)	3 vials (10 ml)

4. PRECAUTIONS

The reliability of the results depends on correct implementation of the following Good Laboratory Practices:

- Do not use a kit beyond its expiration date.
- Do not interchange reagents between kit lots.
- Approximately 30 minutes before beginning the assay, remove the kit from the refrigerator (2°C-8°C) and allow the kit components to reach room temperature (18°C-30°C). Mix the reagents thoroughly by gently inverting the container several times before use. Once the testing is completed, the remaining assay materials should be immediately refrigerated (2°C-8°C).
- Use glassware thoroughly washed and rinsed with deionized water or, preferably, disposable material.

5. HEALTH AND SAFETY INSTRUCTIONS

- All the reagents included in the kit are intended for "*in vitro* use".
- Wear personal protective equipment while handling all reagents and while operating the washer and reader.
- Do not pipette by mouth.
- This product does not contain any biohazardous materials. However, it is used to check the correct operation of equipment which is regularly used with biohazardous material, and it is normal to assume that it comes in contact with contaminated parts (tubing, work surfaces, wastes tanks, manifold, absorbance reader, etc.) during the course of its use. As a consequence, waste material should be considered biohazardous when disposing or treating.

- Clean up all spills immediately and thoroughly. Rinse with water or a mild detergent. Disinfect the area in case of spills involving biohazardous materials. Dispose of all contaminated materials appropriately.
- Dispose of all waste in accordance with applicable national and/or local regulations.
- Chemical reagents should be handled in accordance with Good Laboratory Practices.



WARNING: Components C0, C1, C2, C3 and C4 contain $\leq 0.1\%$ ProClin 300

H317: May cause an allergic skin reaction.

P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

P333+P313: If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P501: Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

- For hazard and precaution recommendations related to some chemical components in this test kit, please refer to the pictogram(s) mentioned on the labels and the information supplied at the end of instructions for use. The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Clean water
- Calibrated single and multichannel, electronic or mechanical pipettors (10 μ l to 500 μ l)
- Absorbent paper.
- Calibrated microplate reader : dual-wavelength photometer (492/620 nm).

7. PREPARATION OF THE REAGENTS

Note: Before use, allow reagents to reach room temperature (18°C-30°C).

1) Ready to use reagents

Reagent 1 (C0): Color Solution C0

Reagent 2 (C1): Color Solution C1

Reagent 3 (C2): Color Solution C2

Reagent 4 (C3): Color Solution C3

Reagent 5 (C4): Color Solution C4

2) Reagents needing preparation

Water vials: Fill the required number of empty vials with 14 ml of clean water.

8. STORAGE CONDITIONS - SHELF LIFE

The kit should be stored in a refrigerator (at 2°C to 8°C). When kept at storage temperature, each reagent contained in the Pipettor – Washer PE Kit can be used until the expiration date on the package.

Once the testing is completed, remaining assay materials should be immediately refrigerated (at 2°C to 8°C).

9. ASSAY PROCEDURE

Strictly follow the manufacturer's procedure.

The assay procedure depends on the instrument you intend to test. Refer to each instrument's performance evaluation procedure.

10. RESULTS CALCULATION AND INTERPRETATION

Result calculations and interpretations depend on the tested instrument and on the specific verification procedure used. Refer to each instrument's performance evaluation procedure.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com



BIO-RAD

VEIKIMO VERTINIMO RINKINYS, NAUDOJIMO INSTRUKCIJA

89894

204. Rinkinyje yra 10 plokštelių (anglų kalbos apraše nurodyta)

KOMPLEKTAS SKIRTAS LAŠINTUVO SISTEMŲ IR MIKROPLOKŠTELIŲ PLAUTUVIŲ
ĮVERTINIMUI NAUDOJANT KOLORIMETRINĮ METODĄ

Gamintojo kokybės kontrolė

Visi pagaminti ir komercializuoti reagentai yra stebimi kokybės kontrolės pradedant nuo pradinių neapdirbtų medžiagų iki galutinio komercializuoto produkto.

Kiekviena partija yra patikrinama pagal taikomus kriterijus ir tik atitikus jiems produkcija yra paleidžiama į prekybą.

Įrašai susiję su kiekvienos partijos produkcija ir kontrole yra laikomi mūsų kompanijoje.

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Parnaušas*
Parašas: *Adas Parnaušas*
Patento numeris: *U0025033*

TURINYS

1. NUMATYTAS NAUDOJIMAS.....	2
2. TESTO PRINCIPAS.....	2
3. KOMPLEKTO KOMPONENTAI.....	3
4. PERSPĖJIMAI.....	3
5. SVEIKATOS IR SAUGUMO INSTRUKCIJOS.....	4
6. REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS.....	4
7. REAGENTŲ PARUOŠIMAS.....	5
8. LAIKYMO SĄLYGOS – GALIOJIMO LAIKAS.....	5
9. ANALIZĖS PROCEDŪRA.....	5
10. REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS IR INTERPRETAVIMAS.....	5

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Pavičius*
Parašas: *[Signature]*
Patento numeris: U 0025033

1. NUMATYTAS NAUDOJIMAS

Veikimo vertinimo rinkinys yra kolorimetrinės analizės rinkinys, skirtas imunofermentinio analizatoriaus pipetavimo, įsiurbimo, skiedimo ir mikroplokštelių plautuvo patikrai.

Siekiant užtikrinti atitikimą originalioms gamintojo sąlygoms ir specifikacijoms bei garantuoti tinkamą veikimą, analizatoriai naudojami in vitro diagnostikoje turi būti tikrinami įdiegiant ir reguliariais intervalais visą instrumento naudojimo laiką. Patikros intervalus, priklausomai nuo instrumento apkrovos, nustato imunfermentinio analizatoriaus naudotojas.

Bet koks skirtumas nuo tikėtinu verčių turi būti laikomas kaip nukrypimas ir turi būti imtasi priemonių ištaisyti šį neatitikimą, kol bus gautos tinkamos vertės.

Testo teigiamas/neigiamas kriterijus ir taisymo veiksmų gidas priklauso nuo bandomos įrangos ir šie gidai pateikiami su kiekvienos įrangos vertinimo procedūra.

204. Rinkinys Performance Evaluation Kit Pipettor Washer yra skirtas pipetavimo ir plovimo procesų teisingumo ir tikslumo įvertinimui, galima naudoti, bet kokiai mikroplokštelių apdorojimo įrangai, jos parametrų įvertinimui t.y., apiima BEP200 ir Immunomat analizatorius

2. TESTO PRINCIPAS

Veikimo vertinimo rinkinys susideda iš dažų tirpalų specialiai pritaikytų matuoti įvairių skysčio kiekių dispensijas (10 -300 ul) arba likusį kiekį po aspiracijos (0-15 ul). Komplektą sudaro 16 buteliukų skirtingos koncentracijos dažų tirpalų ir 3 tušti buteliukai, kurie užpildomi švariu vandeniu. Dažai yra pasirenkami taip, kad atitiktų Beer-Lambert teisę ir būtų saugūs vartotojui bei aplinkai. Norint iširti dispensijos veikimą, įranga išleidžia atitinkamą dažų kiekį į mikroplokštelę. Po to, kai mikroplokštelės šulinėliai yra išmaišomi, mikroplokštelės skaitytuvas išmatuoja absorbcijos vertes ir suskaičiuoja išleistą kiekį pagal diapazoną, kuris rankiniu būdu buvo išleistas kvalifikuoto techniko. Norint iširti aspiracijos veikimą, įranga aspiruoja medžiagą iš prieš tai dažais užpildytos mikroplokštelės. Po vandens pridėjimo kiekiui pasiekti ir maišymo, mikroplokštelės skaitytuvas išmatuoja absorbcijos vertes ir suskaičiuoja likusį kiekį pagal diapazoną, kuris rankiniu būdu buvo išleistas kvalifikuoto techniko. Tada galima suskaičiuoti veikimo statistiką.

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Parnigys*
Parašas: *Adas Parnigys*
Patento numeris: U 0025033

3. KOMPLEKTO KOMPONENTAI

Visi reagentai naudojami tik in vitro diagnostikoje.

ETIKETĖ	REAGENTŲ RŪŠIS	KIEKIS
	Mikroplokštelė Standartinė tuščia 8 x 12 mikroplokštelė	10 plokštelių
	Tuščias 15 ml buteliukas: Tuščias buteliukas užpildomas švriu vandeniu	3 buteliukai (tušti)
C0	Spalvotas tirpalas C0 Dažų tirpalas Tris NaCl buferyje turintis Tween 20 Konservantas: ProClin™ 300 0.1%	4 buteliukai (14 ml)
C1	Spalvotas tirpalas C1 Dažų tirpalas vandenyje Konservantas: ProClin™ 300 0.1%	3 buteliukai (2 ml)
C2	Spalvotas tirpalas C2 Dažų tirpalas vandenyje Konservantas: ProClin™ 300 0.1%	3 buteliukai (2 ml)
C3	Spalvotas tirpalas C3 Dažų tirpalas vandenyje Konservantas: ProClin™ 300 0.1%	3 buteliukai (10 ml)
C4	Spalvotas tirpalas C4 Dažų tirpalas vandenyje Konservantas: ProClin™ 300 0.1%	3 buteliukai (10 ml)

4. PERSPĖJIMAI

Rezultatų patikimumas priklauso nuo tinkamo žemiau pateikiamo geros laboratorijos praktikos pritaikymo ir įgyvendinimo:

- Komplekto su pasibaigusiu galiojimo data naudoti negalima.
- Nemaišykite skirtingų partijų reagentų.
- Maždaug 30 minučių iki analizės pradžios, išimkite rinkinį iš šaldytuvo (2°C -8°C) ir leiskite rinkinio komponentams pasiekti kambario temperatūrą (18°C-30°C). Išmaišykite reagentą švelniai sukdami konteinerį keletą kartų prieš naudojimą. Kai bandymai yra atlikti, likusi analizės medžiaga turi būti atšaldoma (2°C -8°C).
- Stiklinius indus naudokite tik gerai juos išplovus ir praskalavus su dejonizuotu vandeniu arba naudokite vienkartinės medžiagas.

5. SVEIKATOS IR SAUGUMO INSTRUKCIJOS

- Visi reagentai esantys rinkinyje yra skirti tik in vitro diagnostikai.

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Parnaušas*
Parašas: *Adas Parnaušas*
Patento numeris: U0025033

- Dėvėkite asmeninę apsauginę įrangą tada kai naudojatės visais reagentais bei naudodami plovyklę ir skaitytuvą.
- Nelašinkite pipete naudodamiesi burna.
- Šis produktas neturi biologiškai pavojingų medžiagų ar pavojingų cheminių reagentų. Tačiau reikia atkreipti dėmesį į tai, jog testuojama įranga yra naudojama su potencialiai pavojingomis medžiagomis, todėl atliekų medžiagos turi būti laikomos biologiškai pavojingomis.
- Visus išsiliejimus nedelsdami nuvalykite. Praskalaukite vandeniu ar švelniu detergentu. Išsipylus biologiškai pavojingoms medžiagoms, išpylimo vietą išvalykite su dezinfektantu. Visas užterštas medžiagas išmeskite tinkamai.
- Visas atliekas išmeskite pagal atitinkamus vietinius šalies ar vietos reikalavimus.
- Cheminiai reagentai turi būti naudojami pagal geros laboratorijos praktikos taisykles.
- Venkite dažų tirpalų kontakto su oda ar gleivine.



ProClin™ 300 0.1%: Dirginantis

R43: Gali sukelti odos jautrumą.

S28-37: Po kontakto su oda, nedelsdami paveiktą odą nuplaukite gausiu kiekiu vandens ir muilo.

Xi-dirginantis Mūvėkite tinkamas pirštines

- Paprašius suteikiamas medžiagos saugumo duomenų lapas.

6. REIKALINGOS, BET NETIEKIAMOS MEDŽIAGOS

- Švarus vanduo.
- Kalibruotas vieno arba daugiau kanalų elektroninis arba mechaninis lašintuvas (10 ul iki 500 ul).
- Absorbuojantis popierius.
- Kalibruotas mikroplokštelės skaitytuvas: dvigubo bangos ilgio fotometras (492/620nm).

7. REAGENTŲ PARUOŠIMAS

PASTABA: Prieš naudojimą leiskite reagentams pasiekti kambario temperatūrą (18°C-30°C).

1) Naudojimui paruošti reagentai

Reagentas 1 (C0): Spalvotas tirpalas C0

Reagentas 2 (C1): Spalvotas tirpalas C1

Reagentas 3 (C2): Spalvotas tirpalas C2

Reagentas 4 (C3): Spalvotas tirpalas C3

Reagentas 5 (C4): Spalvotas tirpalas C4

2) Reagentai, kuriems reikia paruošimo

Vandens buteliukai:

Užpildykite reikiamą skaičių tuščių buteliukų su 14 ml švaraus vandens.

8. LAIKYMO SĄLYGOS – GALIOJIMO LAIKAS

Komplektas turi būti laikomas šaldytuve (2°C -8°C). Laikant pagal laikymo sąlygas, kiekvienas reagentas esanti lašintuvo-plautuvės veikimo įvertinimo komplekte gali būti naudojami iki galiojimo laiko pabaigos, kuris nurodomas ant pakuotės etiketės.

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Parungas*
Parašas: *[Signature]*
Patento numeris: U0025033

Atlikus bandymus, likusi analizės medžiaga turi būti nedelsiant atšaldoma (2°C -8°C).

9. ANALIZĖS PROCEDŪRA

Griežtai laikytės pateiktos procedūros.

Analizės procedūra priklauso nuo įrenginio, kuriam atliekate kontrolę. Remkitės kiekvieno įrenginio standartinėmis veikimo patvirtinimo procedūromis.

10. REZULTATŲ SKAIČIAVIMAS IR INTERPRETAVIMAS

Rezultatų skaičiavimas ir interpretavimas priklauso nuo kontroliuojamo įrenginio ir specifinės patvirtinimo procedūros. Remkitės kiekvieno įrenginio veikimo patvirtinimo procedūros informacija.

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Algis Povungis*
Parasas: *[Signature]*
Patento numeris: U0025033

 Gamintojas	 Katalogo numeris
 Partijos numeris	 Įgaliotas atstovas
 Laikymo temperatūros ribos	 Galiojimo data MMMM/mm/DD
	 Informacija pateikiama naudojimo instrukcijoje



Bio-Rad

3, Bd Raymond Poincare
92430 Marnes-la-Coquette – Prancūzija
Tel.: 33 (0) 1 47 95 60 00
Faks.: 33 (0) 1 47 41 91 33

06/2006
Kodas 883530

Išversta teisingai
Su LR BK 295 str. susipažinęs
Vertėjas: *Adas Pavičius*
Parašas: *[Signature]*
Patento numeris: U0025033

Highlights of Immunomat™

- **SERION ELISA Analyzer** for medium to high throughput applications
- Validated for **antibody detection** in serum, plasma or cerebrospinal fluid (CSF), for **avidity determination** and **antigen detection** with **SERION ELISA immunoassays**
- **Short loading times** by **barcode identification** of samples, reagents and microtiter plates
- Processing of **up to 16 different assays per plate**
- **Reload function** for patient samples, reagents and microtiter plates
- **2D hand barcode scanner** for **parameters of quality control certificates**
- **Multishot dispenser function** and **memory function for tip racks**
- **Optimize function** for scheduling for an **efficient workload** of the instrument
- **Clot detection** and **bubble kill function** guarantee **walk-away functionality**
- **Level sensors for fluid containers** with **automated warning** in case of **lack of reagents or filled waste container**
- **Easy access to buffers and reagents**
- Fast and **quantitative evaluation** of SERION ELISA immunoassays
- **Parameter- or patient-orientated result reports**
- **Listing of test reagents**
- **Import/export function for reagents**
- Integrated **reports for quality controls** of standards and controls
- **Bi-directional connection to laboratory software systems** via ASTM interface

Order Information of Immunomat™ and Lab Ware

Immunomat™

Order Nr.: VT 020

SERION Clean, cleaning solution, 500 ml, 5 x conc.

Order Nr.: VT 125

Deep well microtiter plates, 50 pieces

Order Nr.: VT 124

Pipetting tips, 300 µl, 18 x 960 tips

Order Nr.: VT 111

Pipetting tips, 1100 µl, 10 x 960 tips

Order Nr.: VT 112

Plastic bottles, white, with cap, 35 ml, 100 pieces

Order Nr.: VT 113

Plastic bottles, yellow, with cap, 35 ml, 100 pieces

Order Nr.: VT 114

Plastic bottles, white, with cap, 50 ml, 100 pieces

Order Nr.: VT 115

Glas bottles, with cap, 2.5 ml, 323 pieces

Order Nr.: VT 116

Glas bottles, with cap, 2.5 ml, 30 pieces

Order Nr.: VT 116-30

Waste bags, 10 pieces

Order Nr.: VT 051