

HAV IgM

“Capcure” ELISA test pro stanovení IgM
protilátek proti viru hepatitidy A
v lidském séru a plazmě

pouze pro diagnózu “*in vitro*”



DIA.PRO
Diagnostic Bioprobes Srl,
Via Columella n° 31, 20128
Milano - Itálie

Telefon +39 02 27007161,
fax +39 02 26007726,
e-mail: diapro@tin.it

REF AVM.CE
96 testů

HAV IgM**POUŽITÍ**

Enzymatický imunologický test (ELISA) pro stanovení obsahu protilátek IgM proti viru hepatitidy A v krevní plazmě a krevním séru systémem "IgM capture."

Pouze pro použití „*in vitro*“.

CHARAKTERISTIKA

Virus hepatitidy A (neboli HAV) je neopouzdrěný ikosaedrický (dvacetistěnný) RNA virus s lineárním jednovláknovým genomem, kódovaný pouze pro jediný známý serotyp.

HAV má čtyři hlavní strukturální polypeptidy a je lokalizován pouze v cytoplazmě lidských hepatocytů.

Cesta infekce je převážně orálně-fekální, a má inkubační dobu 2 až 7 týdnů, během níž může být HAV detekován ve stolici.

Infekce HAV nezpůsobuje žádné chronické hepatitidy a komplikace jsou zřídka.

Tato infekce stimuluje u pacienta silnou imunologickou odpověď nejprve se zvýšenou koncentrací IgM, později pak koncentrací IgG, jež přetrvává mnoho let po infekci. Stanovení hladin IgG a IgM může pomoci rozpoznat infekční povahu onemocnění, klasifikaci viru, který infekci způsobuje a také fázi infekčního cyklu.

PRINCIP EIA TESTU

Tento test je založen na principu "capture", tj. navázání IgM protilátek ze vzorku na pevnou fázi nanesenou na stěny jamky mikrotitrační destičky potažené protilátkami anti-hIgM.

Po promytí všech ostatních komponent vzorku a zejména protilátek IgG, se specifický IgM zachycený na pevné fázi detekuje přidáním purifikovaného deaktivovaného HAV, značeného peroxidázou (HRP) konjugovanou s protilátkou.

Po inkubaci se jamky promyjí, aby se odstranil nenavázaný konjugát, a poté se přidá chromogen/substrát.

Bezbarvý substrát se za přítomnosti peroxidázy hydrolyzuje na zabarvený konečný produkt, jehož optická hustota je měřitelná a je přímo úměrná množství protilátek vytvořených proti HAV.

OBSAH SOUPRAVY

Každá souprava obsahuje množství reagentů dostačující na provedení 96 testů.

Mikrotitrační destička: MICROPLATE

12 stripů s 8 jamkami pokrytými anti-lidskou IgM protilátkou zatavených v ochranném sáčku s vysoušecím prostředkem. Před otevřením sáčku nechejte mikrotitrační destičku dosáhnout pokojové teploty. Nepoužité stripy opět pevně uzavřete do sáčku a skladujte při teplotě 2-8 °C.

Negativní kontrolní vzorek: CONTROL -

1x2 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje kozí sérové proteiny; 10 mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.1% Tween 20; 0.09 % azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans. Negativní kontrola je bezbarvá.

Pozitivní kontrolní vzorek: CONTROL +

1x2 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje anti HAV IgM kozích sérových proteinů, 10 mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.1% Tween 20; 0.09 % azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans.

Pozitivní kontrola je označena zelenou barvou.

Kalibrátor: CAL ...

Obsahuje anti HAV IgM, 2% BSA, 10 mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.09 % azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans.

Poznámka: Objem nezbytný k rozpuštění obsahu lahvičky se může lišit u jednotlivých šarží. Prosím použijte objem uvedený na etiketě.

Koncentrát promývacího pufru: WASHBUF 20X

1x60 ml. 20ti násobný koncentrát, který se před použitím ředí destilovanou vodou. Složení: 10 mM PBS o pH 7.0+/-0.2; 0.05% Tween 20 a 0.05% Kathon GC.

Enzymatický konjugát: CONJ

1x0,8 ml. 20x koncentrovaný. Obsahuje s peroxidázou konjugované protilátky specifické pro HAV, 10 mM Tris pufr o pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC.

Antigeny HAV: Ag HAV

1x16ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje inaktivované a stabilizované HAV, 10 mM Tris pufr o pH 6.8+/-0.1, 2% BSA, 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC.

Konjugát je označen červenou barvou.

Roztok na ředění vzorků: DILSPE

2x60ml. Obsahuje proteinový pufr pro ředění vzorků, 10 mM Tris pufr o pH 6.0+/-0.1, 0.1% Tween 20, 0.09% azid sodný a 0.1% Kathon GC.

Roztok je označen modrou barvou.

Chromogen: SUBS TMB

1x16 ml. Obsahuje 50 mM citrát-fosfátový pufr o pH 3.5-3.8; 4% DMSO; 0.03% tetramethylbenzidin (TMB) a 0.02% peroxidu vodíku (H₂O₂).

Poznámka: Skladujte v temnu.

Stop roztok:

1x15ml, lahvička obsahuje 0.3 M roztok kyseliny sírové H_2SO_4 . *Pozor: Zabraňte kontaktu s očima a pokožkou. Dráždivá látka - Xi R36/38, S2/26/30.*

Krycí fólie na mikrotitrační destičku.

Instrukční manuál

MATERIÁL NEDODÁVANÝ V SOUPRAVĚ

1. Mikropipety a jednorázové špičky.
2. Redestilovaná voda.
3. Stopky s rozsahem 60 a více minut.
4. Savý papír.
5. Inkubátor mikrotitračních destiček pro teplotu $+37^\circ C$.
6. ELISA reader s filtry 450 nm a 620-630 nm.
7. Promývačka mikrotitračních destiček.
8. Vortex

BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Se soupravou smí pracovat pouze vyškolený personál pod dohledem doktora medicíny, zodpovědného za chod laboratoře (supervisor).
2. Personál provádějící vyšetření má být oblečen v ochranném laboratorním oděvu a v gumových rukavicích a má mít ochranné brýle. Vyvarujte se použití ostrých předmětů (jehel, žiletek). Personál má být proškolen, jako to doporučuje Centrum pro kontrolu chorob (Centre for Disease Control) / Národní institut zdraví (U.S. Institutes of Health publication) "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984
3. Personál pracující se vzorkem má být vakcinován proti HAV a HBV, a to vakcínami, které jsou dostupné, bezpečné a efektivní.
4. Laboratorní prostředí má být kontrolováno tak, aby se zabránilo kontaminaci otevřených lahvíček a mikrotitrační destičky během používání soupravy mikroorganismy z prachu nebo vzduchu. Chromogen/Substrát nevystavujte působení světla.
5. Skladujte soupravu při $2-8^\circ C$ v chladničce s kontrolovanou teplotou nebo v chladné místnosti.
6. Nemíchejte reagentie pocházející z různých šarží. Doporučujeme raději nepoužívat ani reagentie ze stejné šarže, ale pocházející z různých souprav.
7. Zkontrolujte, zda jsou všechny reagentie čiré a zda neobsahují viditelné částice nebo shluky. Pokud tomu tak není, použijte k vyšetření novou soupravu.
8. Zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každého vzorku.
9. Zabraňte křížové kontaminaci mezi reagentiemi používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každé reagentie.
10. Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace celé soupravy i jednotlivých lahvíček.
11. Všechny vzorky jsou potenciálně infekční. Z tohoto důvodu by práce se všemi vzorky lidského séra a všemi reagenty soupravy měly být prováděny podle předpisu

Biosafety Level 2, jak doporučuje text Centers for Disease Control/U.S. Institutes of Health publication "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.

12. Doporučujeme používat jednorázové plastové nádoby pro přípravu tekutých komponent nebo pro přenos do automatizovaného pracoviště, aby se zabránilo křížové kontaminaci.

13. Odpad vzniklý během práce se soupravou musí být likvidován v souladu s národními předpisy a zákony, které se týkají laboratorního odpadu – chemických a biologických substancí. Zejména tekutý odpad vzniklý při promývání, který obsahuje zbytky kontrolních roztoků a vzorků, má být ošetřen jako potenciálně infekční materiál a před zařazením do odpadu má být inaktivován. Doporučený postup inaktivace je ošetření 10% chlornanem sodným nebo tepelná inaktivace v autoklávu při $121^\circ C$ po dobu 20 minut.

14. Náhodně rozlitý vzorek musí být odsát papírovým ubrouskem napuštěným desinfekčním činidlem a místo poté omyto vodou. Ubrousek musí být poté vyhozen do příslušného kontejneru určeného pro infekční odpad.

15. Kyselina sírová je dráždivá. V případě rozlití omyjte zasažený povrch velkým množstvím vody.

16. S ostatními odpadními materiály, které vznikly při používání soupravy (např. jednorázové špičky, mikrotitrační destička) se musí zacházet jako s potenciálně infekčním odpadem a měly by být zlikvidovány podle národních směrnic a zákonů, které se týkají laboratorního odpadu.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Souprava je určena k vyšetřování vzorků lidského krevního séra nebo plasmy. Vyhněte se přidávání konzervačních látek do vzorků, které by mohly potlačit enzymatickou reakci konjugátu, což by vedlo k falešně negativním výsledkům.

Vzorky musí být jasně označeny kódem nebo jménem, aby nedošlo k záměně. Pokud je souprava používána pro screening krevních jednotek, velmi doporučujeme označení čárovým kódem a elektronické čtení kódů.

Nepoužívejte hemolyzované a hyperlipemické vzorky, stejně jako vzorky obsahující rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic, protože mohou vést k falešným výsledkům.

Vzorky séra mohou být uloženy při teplotě $2-8^\circ C$ až po dobu pěti dnů od odběru. V případě delšího skladování je uchovávejte zmrazené při teplotě $-20^\circ C$. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte neboť takto ošetřené vzorky mohou poskytovat falešné výsledky.

Pokud jsou přítomny částice, odstředte vzorek při 2000 RPM po dobu 20 minut nebo jej filtrujte použitím filtru $0.2-0.8 \mu$ až do vyčistění vzorku.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A UPOZORNĚNÍ

1. Mikrotitrační destička:

Nechte mikrotitrační destičku vytemperovat na pokojovou teplotu (asi 1 hodinu) před otevřením sáčku. Zkontrolujte vysoušedlo, jestli není zbarveno tmavě zeleně, což svědčí o defektu při skladování. V takovém případě zkontaktujte zákaznický servis firmy Dia.Pro.

Nepoužité stripy musí být vráceny zpět do hliníkového sáčku spolu s vysoušedlem, pevně uzavřeny a skladovány při 2 až 8°C. Zbytek stripů je stabilní až do doby expirace, pokud indikátor vlhkosti obsažený ve vysoušedle nezmění barvu ze žluté do zelena.

2. Negativní kontrola:

Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

3. Pozitivní kontrola:

Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. S touto komponentou zacházejte jako s potenciálně infekční, i když byl HAV potencionálně přítomný v kontrole chemicky inaktivovaný.

4. Kalibrátor:

Přidejte objem redestilované vody uvedené na etiketě kalibrátoru, aby se lyofilizovaný prášek zcela rozpustil a poté jemně promíchejte na vortexu. Roztok není stabilní. Skladujte zmrazený kalibrátor při -20 °C.

5. Promývací roztok:

Koncentrát musí být před použitím zředěn 20x redestilovanou vodou. Jednou naředěný promývací roztok je stabilní 1 týden při 2 až 8°C. Při přípravě se vyhněte pění, přítomnost bublin by mohla vést ke špatnému účinku promývání.

Pozn.: Jednou naředěný promývací roztok je stabilní 1 týden při 2 až 8°C.

6. Enzymatický konjugát:

Těsně před jeho použitím nařeďte potřebné množství konjugátu 20x náležitým množstvím HAV antigenu, poté pečlivě promíchejte na vortexu.

7. HAV antigen:

Připraveno k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. Obsahuje inaktivované a stabilizované HAV.

6+7. HAV antigen/protilátka komplex:

Asi 5-10 minut před použitím, rozředit 20x koncentrovaný enzymatický konjugát ve správném množství s antigenem HAV. Po zředění dobře promíchejte na vortexu.

Příklad: Chcete-li udělat 2 stripy, zřeďte 100 ul enzymatického konjugátu s 2 ml antigenu HAV.

8. Roztok na ředění vzorků:

Připraveno k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

9. Substrát:

Připraven k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. Buďte opatrní, nekontaminujte tekutinu oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Nevystavujte silnému osvětlení, oxidačním činidlům a kovovým povrchům. Pokud je tato reagentie přenášena, pak ať přenášena pouze

v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

10. Stop roztok:

Připraven k přímému použití. Před použitím opatrně promíchejte na vortexu.

Varování: Dráždivá (Xi R36/38; S2/26/30)

Legenda: R36/38 = dráždí oči a pokožku.

S 2/26/30 = v případě kontaktu s očima, okamžitě vypláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékaře.

PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

1. Mikropipety musí být kalibrovány pro přesné dávkování roztoků, dále musí dekontaminovatelné alkoholem, 10% NaOH nebo běžnými nemocničními desinfekčními prostředky, po případné kontaminaci infekčním vzorkem. Jejich přesnost musí být 1% s odchylkou max. +/-2%.

2. Inkubátor ELISA destiček musí být nastaven na +37°C (tolerance +/-0.5 °C a musí být ověřena správnost teploty. Může být použit jak suchý tak i vlhký typ inkubátoru určený pro ELISA mikrodestičky.

3. Kvalitní ELISA promývačka je vysoce důležitým prvkem pro přesnost analýzy. Promývačka musí být validována a optimalizována před rutinním použitím v laboratoři. Obvykle 4-5 cyklů (odsátí – dispense 350 µl promývacího roztoku = 1 cyklus) je dostatečné pro promytí. Je doporučen namáčecí čas 20-30 sec. mezi cykly. Pro přesné nastavení počtu cyklů je doporučeno provést analýzu negativních a pozitivních kontrol a několika definovaných vzorků se známou pozitivitou, tak aby výsledky odpovídaly požadavkům popsaným v kapitole o validaci testu. U promývačky je potřeba provádět pravidelnou dekontaminaci a validaci podle požadavků výrobce a předpisů SLP.

4. Tolerance pro inkubační časy je +/-5%.

5. ELISA reader musí být vybaven filtrem 450 nm, ideálně i filtrem 620 nebo 630 nm (BLANK). Musí splňovat následující technické parametry: linearita absorbance musí být vyšší nebo rovna 2 ABS, nastavení vlnových délek menší nebo rovno 10 nm, měřicí rozsah nejméně 0.0 – 2.0 ABS, rozptyl měření pod 1%. Optický systém readeru musí být kalibrován a validován na správnost měření dané vlnové délky, reader musí být udržován dle požadavků výrobce a SLP.

6. Pokud používáte ELISA automat, musíte správně nastavit všechny kritické kroky (dispense, inkubace, promytí, čtení, zpracování dat). Stanice musí být udržována a validována odborným servisem dle požadavků výrobce a SLP. Doporučujeme nastavit protokol a validovat jej na souboru kontrol a vzorků se známou pozitivitou. Je potřeba také předcházet možnostem křížové kontaminace při opakované dispenciaci jehlou automatu. Používání ELISA automatu je doporučeno, pokud počet vzorků v jednom běhu je nejméně 30.

7. Dia.Pro zákaznický servis nabízí uživatelům Dia.Pro ELISA souprav nastavení protokolů a jejich optimalizaci na širokou škálu ELISA automatů.

PŘÍPRAVA NA ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

1. Zkontrolujte datum expirace soupravy uvedené na obalu. Nepoužívejte expirované soupravy.
2. Zkontrolujte, zda nejsou tekuté komponenty soupravy kontaminovány viditelnými částicemi nebo sraženinami.
3. Zkontrolujte, zda Chromogen je bezbarvý nebo světle modrý nasátím malého množství sterilní plastovou pipetou.
4. Zkontrolujte, zda při převozu nedošlo k rozbití nějaké lahvičky a zda není uvnitř krabičky vylitá žádná tekutina.
5. Zkontrolujte, zda hliníkový obal mikrotitrační destičky není porušený.
6. Nařed'te si potřebný objem koncentrátu promývacího roztoku, jak je popsáno výše.
7. Ponechte všechny ostatní komponenty soupravy vytemperovat na pokojovou teplotu (asi jednu hodinu) a pak jemně promixujte na vortexu všechny tekuté reagenty.
8. Nastavte ELISA inkubátor na +37°C a připravte ELISA promývačku naplněním naředěným promývacím roztokem podle pokynů výrobce. Nastavte správný počet promývacích cyklů pro její použití s touto soupravou.
9. Zkontrolujte, zda je zapnutý ELISA reader anebo se ujistěte, že bude zapnut minimálně 20 min před měřením.
10. Pokud používáte automat, zapněte ho, zkontrolujte nastavení a ujistěte se, že používáte správný protokol.
11. Zkontrolujte, zda jsou mikropipety nastaveny na požadovaný objem.
12. Zkontrolujte, zda je všechno ostatní vybavení k dispozici a připraveno k použití.
13. V případě nějakých problémů, nepokračujte dále se zpracováním testu a porad'te se s Vaším superviseorem.

VLASTNÍ ANALÝZA

Analýza musí být provedena podle níže popsaného postupu. Zaměřte se zejména na dodržení stejné doby inkubace pro všechny vyšetřované vzorky.

1. Předřed'te vzorky 1:101 (př. 1000 µl ředícího roztoku a 10 µl vzorku. Negativní a pozitivní kontrolu ani kalibrátor neřed'te, jsou připraveny přímo k použití. Pečlivě promíchejte všechny reagenty na vortexu.
2. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku. První jamku A1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK).
3. Dávkujte 100 µl negativní kontroly v triplicátu, 100 µl pozitivní kontroly do jedné jamky, 100 µl kalibrátoru v duplikátu a pak 100µl předředěných vzorků do jednotlivých jamek a ověřte, že vzorky ve všech jamkách jsou modře zbarveny.
4. Inkubujte destičku **60 minut při +37°C**.

Poznámka: stripy zakrývejte přiloženou fólií pouze při manuálním zpracování. Pokud pracujete na analyzátoru stripy, nezakrývejte.

5. Promyjte na automatické promývače pomocí promývacího roztoku, jak bylo popsáno výše.
 6. Přidejte 100 µl HAV antigen/protilátka komplexu do každé jamky s výjimkou A1 a přikryjte fólií. Zkontrolujte, zda jsou všechny jamky zbarveny červeně, kromě jamky A1.
 7. Inkubujte destičku **60 minut při +37°C**
 8. Promyjte destičku stejně jako v bodě 5.
 9. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky, včetně jamky A1. Inkubujte mikrotitrační destičku **při pokojové teplotě (18-24°C) po dobu 20 minut.**
- Důležitá poznámka:** Nevystavujte destičku silnému světlu. Mohlo by se vyvinout silné pozadí.
10. Pipetujte 100 µl Stop roztoku do každé jamky ve stejném sledu jako v předchozích bodech. Přidání kyseliny změní barvu pozitivní kontroly a pozitivních vzorků z modré do žluta.
 11. Změřte intenzitu zbarvení roztoků jamek ELISA readerem při 450 nm pro odečet pozadí i při 620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

Důležitá poznámka:

1. Pokud nemáte k dispozici druhý filtr, ujistěte se, že se na spodní straně mikrotitračních jamek nenachází žádné otisky prstů před měřením při 450 nm. Otisky můžou způsobit falešně pozitivní výsledky při čtení.
2. Měření musí být provedeno hned po přidání Stop činidla, nejpozději do 20 min po jeho přidání. Samooxidace chromogenu, může způsobit silné pozadí.

SCHÉMA POSTUPU

kontrolní vzorky a vzorky od pacienta zředěné v poměru 1:101	100 µl
1. inkubace	60 min
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
immunokomplex	100 µl
2. inkubace	60 min
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
směs TMB a H ₂ O ₂	100 µl
3. inkubace	20 min
teplota	pokojeová
Stop roztok	100 µl
hustota filtru	450 nm

Příklad umístění jednotlivých jamek:

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

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

VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

Kontrola validity soupravy je zajišťována použitím kontrol při každém testu. Souprava je validní, dosáhnou-li kontroly následujících hodnot:

kontrola	hustota 450 nm
jamka pro slepý test (BLANK)	< 0,050 OD 450 nm
negativní kontrola (NC)	< 0,150 OD 450 nm po vynulování
kalibrátor	S/Co > 1
pozitivní kontrola (PC)	> 0,500 OD 450 nm

Pokud výsledky testu dosáhnou výše uvedených hodnot, postupte k dalšímu odstavci. Pokud ne, nepokračujte dále a proveďte následující kontrolu:

Problém	Zkontrolujte
Blank OD > 0.050	1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu
Negativní kontrola OD > 0,150 po blankování	1. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 2. zda byl použit správný promývací roztok a zda jim byla promývačka naplněna před použitím 3. zda nebyla udělána chyba při pipetování kontrol (pozitivní kontroly místo negativní) 4. zda nedošlo ke kontaminaci NC nebo jamek do nichž byla NC napipetována pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu 5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem 6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpané
Kalibrátor S/Co < 1	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování kalibrátoru 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem

Pozitivní kontrola OD < 0.500	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. napipetování negativní kontroly místo pozitivní) 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly.
---	--

VÝSLEDKY

Výsledky se vypočítají pomocí cut-off koeficientu (Co), který vypočítáte pomocí následujícího vzorce:

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0,250$$

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky se interpretují jako poměr vzorku OD 450 nm (S) a hodnoty cut-off koeficientu (Co) - S/Co podle následující tabulky:

S/Co	Interpretace
< 0.8	Negativní
0.8 – 1.2	Hraniční
> 1.2	Pozitivní

Negativní výsledek znamená, že pacient má nedetekovatelnou reaktivitu vůči viru HAV.

U pacienta s dubiálním výsledkem musí být znovu vyšetřen vzorek krve odebraný za 1-2 týdny. Pozitivní výsledek svědčí o infekci virem HAV a pacient by měl být okamžitě léčen.

Příklad výpočtu je uveden níže:

Důležitá poznámka: Následující data nesmí být použita namísto skutečných čísel získaných uživatelem.

Negativní kontrola OD: 0.050 - 0.060 - 0.070
OD450nm

Průměr OD450nm: 0.060

Validace: nižší než 0.150 – akceptováno

Pozitivní kontrola OD: 2.189

Validace: vyšší než 0.500 – akceptováno

$$\text{Cut-off} = 0.060 + 0.250 = 0.310$$

Kalibrátor OD450nm: 0.550 - 0.530

Průměr OD450nm: 0.540 S/Co = 1,7

S/Co vyšší než 1.0 – akceptováno

Vzorek 1: 0.070 OD450nm

Vzorek 2: 1.690 OD450nm

Vzorek 1 S/Co < 0,8 = negativní

Vzorek 2 S/Co > 1,2 = pozitivní

Důležité poznámky:

1. Interpretace výsledků musí být provedena pod dozorem zodpovědné osoby, aby se snížilo riziko chybného úsudku.
2. Všechny pozitivní výsledky musí být potvrzeny alternativní (konfirmační test) předtím než je vyřčena diagnóza virové hepatitidy.
3. Při vydávání výsledků z laboratoře je třeba věnovat velkou pozornost zabránění chybného přenosu dat.
4. Diagnóza infekce virem HAV musí být pacientovi sdělena pouze kvalifikovaným lékařem.

PARAMETRY

1. Diagnostická senzitivita:

Citlivost testu byla stanovena na panelu pozitivních vzorků a porovnáním s výsledky soupravy schválené organizací FDA.

Pozitivní vzorky byly shromážděny od pacientů s akutní infekcí HAV potvrzenou klinickými příznaky a analýzou.

Byla zjištěna 100% citlivost při celkovém počtu více než 100 vzorků.

Výsledky byly poskytnuty společností Boston Biomedica Inc, USA.

2. Diagnostická specifita:

Je definována jako pravděpodobnost, že vzorky s absencí analytu budou vyhodnoceny jako negativní. Pro stanovení přesnosti byla použita jak plazma, připravená různými standardními technikami, tak sérum. Nebyly zjištěny žádné zkřížené reaktivity. Bylo vyšetřeno více než 500 neselektovaných dárců a HAV negativních hospitalizovaných pacientů. Diagnostická specifita byla stanovena vůči soupravě homologované FDA. Byla zjištěna specifita vyšší než 98%.

Nebyla pozorována ani falešná reaktivita způsobená různou metodou přípravy vzorků plasmy různými standardizovanými postupy přípravy (citrát, EDTA, heparin) a séra.

3. Přesnost:

Byla vypočítána pomocí dvou vzorků, jednoho pozitivního a jednoho negativního, vyšetřených v 16 replikátech ve třech samostatných analýzách. Byly zjištěny hodnoty CV v rozmezí 7-15%, při OD450nm, které nevedly ke změně klasifikace vzorku.

OMEZENÍ

Opakovaně falešně pozitivní výsledky byly pozorovány u vzorků s vysokým titrem RF i přes přítomnost neutralizačního činidla. Několikrát zmrazované vzorky obsahující fibrinové částice nebo shluky mohou po rozmrazení dávat falešné výsledky.

LITERATURA

1. Dienstag J.L.. "Hepatitis A Virus : identification, characterization and epidemiologic investigations". Progress in liver disease VI, Popper E., Schaffner F. (eds), pp 343-370, New York, Gruner and Stratton, 1979.
2. Duermeyer W., Van der Veen J., Koster B. "ELISA in Hepatitis A". Lancet. I.: 823-824, 1978
3. Parry J.V., (1981) "Hepatitis A infection: guidelines for the development of satisfactory assays for laboratory diagnosis". The Institute of Medical Laboratory Sciences, 38, 303-311.
4. Lindberg J., Frosner G., Hansson B.G. et al. "Serologic markers of hepatitis A and B in chronic active hepatitis". Scandinavian Journal of Gastroenterology, 13:525-527, 1978.
5. Barbara J.A., Howell D.R., Briggs M., Parry J.V.. "Post transfusion hepatitis A". Lancet (1982), 1-738.
6. Zchoval R., Dienstag J.L., Purcell R.H. "Tests for hepatitis A virus antigen and antibody" in "Hepatitis A". Gerety R.J. (Ed), pp 33-46, Orlando, Academic Press, Inc. 1984

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod dohledem zřízeným systémem řízení jakosti a prostředí, který splňuje požadavky norem EN ISO 13485, a který byl certifikován pod registračním číslem 0318

Vyrábí

Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.
via Columella n° 31 – Milano - Italy

Doc.:	INS AVM.CE	Verze: 1	06/2006
-------	------------	----------	---------

Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

e-mail: laboserv@laboserv.cz