HBe

Ag&Ab

Enzymová imunoanalýza (ELISA) pro stanovení antigenu a protilátek proti viru hepatitidy B 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 HBE.CE
96 testů

HBE Ag&Ab

A. POUŽITÍ

Enzymatický imunologický test (ELISA) pro stanovení obsahu antigenu a protilátek vytvořených proti Hepatitidě B v lidském séru a plazmě.
Souprava je určena k ověření akutní infekce a chronických pacientů podléhajících léčbě.
Pouze pro použití „*in vitro*“.

B. CHARAKTERISTIKA

Antigen hepatitidy B (HBeAg) je známý tím, že se asociuje s virem hepatitidy B nebo HBV replikací.
Bylo zjištěno, že HBeAg je produktem proteolytického štěpení jádra antigenu hepatitidy B (HBcAg), který se vykytuje v hepatocytech, jejichž exprese podléhá kontrole mimojaderné oblasti genomu HBV.
Pokud je HBeAg přítomno jako specifický marker infekce, přítomnost protilátek proti HBeAg je známkou přechodu infekce do rekonvalescence.
Stanovení těchto dvou analytů ve vzorku se stalo významným pro klasifikaci fáze nemoci a prognostickou hodnotou při léčbě infikovaných pacientů.

C. PRINCIP TESTU

HBeAg:
Pokud je HBeAg přítomno ve vzorku, je zachycováno specifickými monoklonálními protilátkami během první inkubace.
V průběhu druhé inkubace po promytí je do jamky přidán indikátor, složený ze směsi dvou specifických monoklonálních protilátek proti HBeAg a značený peroxidasou (HRP). Indikátor se váže na zachycené HBeAg.
Koncentrace navázaného enzymu na pevnou fázi je úměrná množství HBeAg ve vzorku a jeho aktivita je detekována přídavkem chromogenního substrátu během třetí inkubace.
Přítomnost HBeAg ve vzorku je stanovena průměrem vzhledem ke cut-off, což umožňuje semikvantitativní stanovení antigenu.

HBeAb:
Pokud jsou přítomny protilátky proti HBeAg, kompetitují s rekombinačním HBeAg za vzniku přesného množství protilátek proti HBeAg, navázaných v jamkách mikrotitrační destičky.
Kompetitivní analýza se skládá ze dvou inkubací, během první inkubujeme vzorek s recHBeAg, druhá inkubace probíhá s indikátorem, složeného ze dvou monoklonálních protilátek proti HBeAg a značeného peroxidasou (HRP).
Koncentrace navázaného enzymu na pevnou fázi je nepřímo úměrná množství protilátek proti HBeAg ve vzorku a jeho aktivita je stanovena přídavkem chromogenního substrátu v průběhu třetí inkubace.
Koncentrace specifických protilátek HBeAg ve vzorku je stanovena jako průměr vzhledem ke cut-off hodnotě, což umožňuje semikvantitativní stanovení protilátek proti HBeAg.

D. OBSAH SOUPRAVY

Každá souprava obsahuje množství reagencií dostačující na provedení 96 testů.

1. Mikrotitrační destička:

12 lomitelných stripů s 8 jamkami potažených specifickými monoklonálními protilátkami proti HBeAg a poté pokryté proteiny kravského séra zatavených v ochranném sáčku s vysoušecím prostředkem. Před otevřením sáčku nechte mikrotitrační destičku dosáhnout pokojové teploty. Nepoužité stripy opět pevně uzavřete do sáčku a skladujte při teplotě 2-8 °C.

2. Negativní kontrolní vzorek:

Lahvička 1x2,0 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje kravské sérové proteiny; 0,09% azid sodný a 0,1 Kathon GC jako konzervant. Negativní kontrola je bezbarvá.

3. Antigenová pozitivní kontrola:

Lahvička 1x1,0 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje 2% kravského sérového albuminu, neinfekční rekombinační HBeAg, 100 mM tris pufr o pH 7,4+/-0,1, 0,09 azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervant. Pozitivní kontrola je označena zelenou barvou.

4. Protilátková pozitivní kontrola:

Lahvička 1x1,0ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje 2% kravský sérový albumin, lidskou antiHBeAg pozitivní plazmu v koncentraci okolo 10PEI U/ml, 100mM tris pufr o pH 7,4+/-0,1, 0,09% azid sodný a 0,1% Kathon GC jako konzervant. Štítek je označený červeně. Pozitivní kontrola je označena žlutou barvou.

5. Kalibrátor antigenu:

Lyofilizovaný kalibrátor pro protilátky proti HBeAg. Ředěný vodou odpovídající normě EIA jako je označeno na lahvičce. Obsahuje fetální kravské sérum s neinfekčními rekombinantními HBeAg v koncentraci 1PEI U/ml +/- 10%, 0,02 gentamicin sulfát a 0.1% Kathon GC jako konzervant.
Poznámka: Objem nezbytný k rozpuštění obsahu lahvičky se může lišit u jednotlivých šarží. Prosím použijte objem uvedený na etiketě.

6. Protilátkový kalibrátor:

Lyofilizovaný kalibrátor pro protilátky proti HBeAg. Ředěný vodou odpovídající normě EIA jako je uvedeno na lahvičce. Obsahuje fetální kravské sérum, pozitivní plazmu o koncentraci 0,25 PEI U/ml +/-10%, 0,2% gentamycin sulfát a 0,1% Kathon jako konzervant. Štítek je označený červeně.
Poznámka: Objem nezbytný k rozpuštění obsahu lahvičky se může lišit u jednotlivých šarží. Prosím použijte objem uvedený na etiketě.

7. Koncentrát promývacího pufru:

WASHBUF 20X

Lahvička 1x60 ml. 20ti násobný koncentrát.
1x ředěný obsahuje 10 mM fosfátový pufr o pH 7.0+/-0.2; 0.05% Tween 20 a 0.1% Kathon GC.

8. Enzymatický konjugát: CONJ

Lahvička 1x16 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje s peroxidázou konjugovanou se směsí monoklonálních protilátek proti HBeAg, 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.

9. HBe antigen: Ag-HBe

Lahvička 1x10ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje rekombinantní HBeAg, fetální kravské sérum, roztok pufru o pH 8,0+/-0,1, 0,1% Kathon GC a 0,09% azid sodný jako konzervanty.
Reagencie je označena modrou barvou.

10. Chromogen/substrát: SUBS TMB

Lahvička 1x16 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje 50 mM citrát-fosfátový pufr o pH 3.5-3.8; 4% DMSO; 0.03% tetramethylbenzidin (TMB) a 0.02% peroxidu vodíku (H_2O_2).
Poznámka: Skladujte v temnu.

11. Stop roztok: H_2SO_4 0.3 M

Lahvička 1x15ml. 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.

12. Krycí fólie na mikrotitrační destičku.

13. Instrukční manuál

E. POTŘEBNÝ MATERIÁL NEDODÁVANÝ SE SOUPAVOU

1. Mikropipety (150ul, 100ul a 50ul) a jednorázové špičky
2. Voda odpovídající normě EIA (dvakrát destilovaná nebo neionizovaná s přídavkem aktivního uhlí k odstranění oxidačních činidel použitých jako desinfekce)
3. Stopky s rozsahem 60 minut nebo vyšším.
4. Savý papír.
5. Termostatický inkubátor mikrotitračních destiček nastavený na +37°C
6. Reader s filtry 450nm a 620-630nm jako referenčními.
7. Promývačka mikrotitračních destiček
8. Vortex

F. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Se soupravou smí pracovat pouze vyškolený personál pod dohledem lékaře, zodpovědného za chod laboratoře (supervizor).
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 očkován 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 lahviček a mikrotitrační destičky během používání soupravy mikroorganismy z prachu nebo vzduchu. Chromogen/Substrát nevystavujte působení světla a předcházejte vibracím povrchu, na kterém lahvička leží.
5. Skladujte soupravu při 2-8 °C v chladničce s kontrolovanou teplotou nebo v chladné místnosti.
6. Nemíchejte reagencie pocházející z různých šarží. Doporučujeme raději nepoužívat ani reagencie ze stejné šarže, ale pocházející z různých souprav.
7. Zkontrolujte, zda jsou všechny reagencie 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 reagenciemi používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každé reagencie.
10. Nepoužívejte soupravu po vypršení doby exspirace celé soupravy i jednotlivých lahviček.
11. Všechny vzorky jsou potenciálně infekční. Z tohoto důvodu by práce se všemi vzorky lidského séra a všemi reagenciemi soupravy by 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°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.

G. PŘÍPRAVA VZORKŮ

1. Krev odebírejte asepticky z žíly a plazmu nebo sérum připravte použitím standardních technik přípravy vzorku pro klinickou laboratorní analýzu. Nebyl pozorován vliv citrátu, EDTA ani heparinu.
2. Vyhněte se přidávání konzervačních látek do vzorků, které by mohly potlačit enzymatickou reakci konjugátu, což by vedlo k falešně negativním výsledkům.
3. Vzorky musí být jasně označeny kódem nebo jménem, aby nedošlo k záměně.
4. Nepoužívejte hemolyzované a hyperlipemické vzorky, stejně jako vzorky obsahující rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic, protože mohou vést k falešným výsledkům.
5. Vzorky séra mohou být uloženy při teplotě 2–8°C až po dobu pěti dnů od odběru. V případě delšího skladování je uchovávejte zmrazené při teplotě – 20°C. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte, neboť takto ošetřené vzorky mohou poskytovat falešné výsledky.
6. Pokud jsou přítomny částice, odstřeďte vzorek při 2000 RPM po dobu 20 minut nebo jej filtrujte použitím filtru 0.2-0.8 μm až do vyčistění vzorku.

H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A UPOZORNĚNÍ

Na základě studie prováděné na otevřených soupravách se doporučuje otevřenou soupravu zpracovat do tří měsíců od jejího otevření.

1. Mikrotitrační destička:
Nechejte sáček s mikrotitrační destičkou vytemperovat na pokojovou teplotu (asi 1 hodinu) před otevřením. 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 exspirace, pokud indikátor vlhkosti obsažený ve vysoušedle nezmění barvu ze žluté na zelenou.

2. Negativní kontrola:
Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

3. Antigenová pozitivní kontrola:
Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

4. Protilátková pozitivní kontrola:
Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

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

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

7. Promývací roztok:
Koncentrát musí být před použitím zředěn 20x redestilovanou vodou na 1200 ml a před použitím důkladně promíchán. Při přípravě se vyhněte pěnění, přítomnost bublin by mohla vést ke špatnému účinku promývání.
Pozn.: Naředěný promývací roztok je stabilní 1 týden při 2 až 8°C.

8. Enzymatický konjugát:
Připravena k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.
Předcházejte kontaminaci tekutiny oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Pokud je tato reagencie přenášena, pak ať přenášena pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

9. HBE antigen:
Připraveno k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.
Předcházejte kontaminaci tekutiny oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Pokud je tato reagencie přenášena, pak ať přenášena pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

10. Chromogen/substrát:
Připraven k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.
Předcházejte kontaminaci tekutiny oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Nevystavujte silnému osvětlení, oxidačním činidlům a kovovým povrchům. Pokud je tato reagencie přenášena, pak ať přenášena pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

11. Kyselina sírová:
Připravena k přímému použití. Před použitím dobře 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.

I. PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

1. Mikropipety musí být kalibrovány pro přesné dávkování roztoků, dále musí být 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 destičky.
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 – dispenze 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, měřící 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. Používáte-li 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 dispenzaci 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.

L. PŘÍPRAVA NA ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

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

V případě nějakých problémů, nepokračujte dále se zpracováním testu a poraďte se s Vaším dodavatelem.

M. VLASTNÍ ANALÝZA

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

A) HBe antigen

1. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku a opatrně označte jamky pro kontroly, kalibrátory a vzorky.
2. První jamku A1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK).
3. Dávkujte 100 µl negativní kontroly v triplikátu, 100 µl kalibrátoru antigenu v duplikátu a 100 µl antigenové pozitivní kontroly do jedné jamky.
4. Poté pipetujte 100µl předředěných vzorků do jednotlivých jamek.
5. Zkontrolujte, že vzorky byly umístěny správně buď okem (existuje výrazný barevný rozdíl mezi prázdnou a plnou jamkou) nebo na readeru při 450/620nm (vzorky poskytují hodnotu OD vyšší než 0,100).
6. Inkubujte destičku **60 minut při +37°C.**

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

7. Po inkubaci promyjte na automatické promývačce pomocí promývacího roztoku, jak bylo popsáno výše (odst. I.3).
8. Přidejte 100 µl konjugátu do každé jamky s výjimkou A1určené pro blank.

Pozn.: buďte opatrní při pipetování do jamek, aby nedošlo k poškození povrchu jamky špičkou a předcházejte kontaminaci.

9. Zkontrolujte, že se reagencie dostatečně rozpustily a poté inkubujte destičku **60 minut při +37°C**
10. Po druhé inkubaci promyjte destičku stejně jako v bodě 7.
11. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky, včetně jamky A1.

Důležitá poznámka: *Nevystavujte destičku silnému světlu. Mohlo by se vyvinout silné pozadí.*

12. Inkubujte mikrotitrační destičku chráněnou před světlem **při pokojové teplotě (18-24°C) po dobu**

20 minut. Jamky s pozitivní kontrolou a pozitivní vzorky se zbarví z bezbarvé na modrou.

13. Pipetujte 100 µl kyseliny sírové do každé jamky ve stejném sledu jako v předchozích bodech. Přidání stop roztoku zbarví pozitivní kontrolu a pozitivní vzorky z modré na žlutou.
14. Změřte intenzitu zabarvení roztoků jamek ELISA readerem při 450 nm, pro odečet pozadí i při 620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

B) HBe protilátky

1. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku a opatrně označte jamky pro kontroly, kalibrátory a vzorky.
2. První jamku A1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK).
3. Dávkujte 50 µl negativní kontroly v triplikátu, 50 µl protilátkového kalibrátoru v duplikátu a 50 µl protilátkové pozitivní kontroly do jedné jamky.
4. Poté pipetujte 50µl předředěných vzorků do jednotlivých jamek.
5. Zkontrolujte, že vzorky byly umístěny správně buď okem (existuje výrazný barevný rozdíl mezi prázdnou a plnou jamkou) nebo na readeru při 450/620nm (vzorky poskytují hodnotu OD vyšší než 0,100).
6. Přidejte 50 µl HBe antigenu do každé jamky kromě jamky A1.
7. Inkubujte destičku **60 minut při +37°C.**

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

8. Po inkubaci promyjte na automatické promývačce pomocí promývacího roztoku, jak bylo popsáno výše (odst. I.3).
9. Pokračujte jako při zpracování HBe antigenu od bodu 8 až do konce.

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. Samovolná oxidace chromogenu může způsobit silné pozadí.

SCHÉMA POSTUPU

HBe antigen

Kontroly a kalibrátory Pacientské vzorky	100 µl 100 µl
1. inkubace	**60 min**
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
Enzymový konjugát	100 µl
2. inkubace	**60 min**
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
směs TMB a H2O2	100 µl
3. inkubace	**20 min**
teplota	pokojová
Stop roztok	100 µl
hustota filtru	450 nm

HBe protilátky

Kontroly a kalibrátory Pacientské vzorky	50 µl 50 µl
1. inkubace	**60 min**
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
Enzymový konjugát	100 µl
2. inkubace	**60 min**
teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
směs TMB a H2O2	100 µl
3. inkubace	**20 min**
teplota	pokojová
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:

HBe antigen

jamka	OD 450 nm
Blank	< 0,100 OD 450 nm
Negativní kontrola (NC)	< 0,150 OD 450 nm při koeficientu variace < 30%
Kalibrátor antigenu	S/Co > 2,0
Pozitivní kontrola (PC)	> 1,500 OD 450 nm

HBe protilátky

jamka	OD 450 nm
Blank	< 0,100 OD 450 nm
Negativní kontrola (NC)	> 1,000 OD 450 nm při koeficientu variace < 10%
Protilátkový kalibrátor	OD 450 nm < NC/1,5
Pozitivní kontrola (PC)	OD 450 nm < NC/10

Pokud výsledky testu dosáhnou výše uvedených hodnot, postupte k dalšímu odstavci.

Pokud ne, nepokračujte dále a proveďte následující kontrolu:

HBeAg

Problém	Zkontrolujte
Blank > 0.100 OD450nm	1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu
Negativní kontrola > 0,150 OD450nm 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 pipetována, pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu 5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem 6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpány
Kalibrátor Co/S < 2	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 < 1,500 OD450nm	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. pipetování negativní kontroly místo pozitivní) 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly.

HBe protilátky

Problém	Zkontrolujte
Blank > 0.100 OD450nm	1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu
Negativní kontrola < 1,000 OD 450 nm po blankování Koeficient variace > 10%	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 pipetována, pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu 5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem 6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpány
Kalibrátor OD450nm > NC/1,5	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 < 1,500 OD450nm	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. pipetování negativní kontroly místo pozitivní) 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly

V případě, že nastane některý z výše uvedených problémů, kontaktujte svého dodavatele pro jeho řešení.

P. VÝSLEDKY

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

HBeAg:

NC + 0,100 = Cut-Off (Co)

HBeAb:

(NC + PC) / 3 = Cut-Off (Co)

Důležitá poznámka: *Pokud je výsledek počítán ELISA automatem, ujistěte se, že je použit správný vzorec pro výpočet hodnoty cut-off a vydává správné výsledky.*

Q. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky se interpretují následovně:

HBeAg:

S/Co	Interpretace
< 0.9	Negativní
0.9 – 1.1	Hraniční
> 1.1	Pozitivní

HBeAb:

S/Co	Interpretace
< 0.9	Negativní
0.9 – 1.1	Hraniční
> 1.1	Pozitivní

Poznámka:
S = OD450nm vzorku
Co = hodnota cut-off

Příklad výpočtu pro HBeAg analýzu:

Následující data nesmí být použita místo reálných dat získaných uživatelem.

Negativní kontrola: 0,020 – 0,030 – 0,025 OD450nm
Průměrná hodnota: 0,025 OD450nm
Nižší než 0,150 – akceptováno

Pozitivní kontrola: 2,489 OD450nm
Vyšší než 1,500 – akceptováno

Cut-off = 0,025 + 0,100 = 0,125
Kalibrátor: 0,520 – 0,540 OD450nm
Průměrná hodnota: 0,530 OD450nm S/Co = 4,2
S/Co vyšší než 2,0 – akceptováno

Vzorek 1: 0,030 OD450nm
Vzorek 2: 1,800 OD450nm
Vzorek 1 S/Co < 0,9 = negativní
Vzorek 2 S/Co > 1,1 = pozitivní

Příklad výpočtu pro analýzu HBeAb:

Následující data nesmí být použita místo reálných dat získaných uživatelem.

Negativní kontrola 2,100 – 2,200 – 2,000 OD450nm
Průměrná hodnota 2,100 OD450nm
Vyšší než 1,000 – akceptováno

Pozitivní kontrola 0,100 OD450nm
Nižší než NC/10 – akceptováno

Cut-off = (2,100 + 0,100)/3 = 0,733
Kalibrátor: 0,720 – 0,760 OD450nm
Průměrná hodnota: 0,740 OD450nm
OD450nm < NC/1,5 – akceptováno

Vzorek 1: 0,020 OD450nm
Vzorek 2: 1,900 OD450nm
Vzorek 1 Co/S > 1,1 = pozitivní
Vzorek 2 Co/S < 0,9 = negativní

Důležité poznámky:

1. *Interpretace výsledků má podléhat kontrole odpovědné osoby pro omezení chyb nebo chybných vydávání výsledků.*
2. *Identifikace klinického stavu pacienta s HBV (akutní, chronická, asymptomatická hepatitida) má být prováděna na bázi i dalších markerů HBV infekce (HBsAg, HBsAb, HBcAb, HBcIgM)*
3. *Pokud jsou výsledky přenášeny z laboratoře do jiného zařízení, věnujte pozornost k předejití chyb při přenosu dat*
4. *Pacient musí být seznámen s přítomností viru hepatitidy kvalifikovaným lékařským pracovníkem.*

PARAMETRY

A) HBeAg

1. LIMIT DETEKCE

Limit detekce pro analýzu je dán průměrem Mezinárodních standardů pro HBeAg daných Institutem Paula Ehrlicha (PEI).
Data získaná zjišťováním limitu detekce tří šarží jsou v tabulce níže:

HBE.CE Lot ID	PEI U/ml HBeAg
0103	0,25
0103/2	0,25
0303	0,25

Souprava byla testovaná i po vydání Accurun # 51, vyrobenou firmou Boston Biomedica Inc, USA, po ředění v FCS. Výsledky jsou níže:

HBE.CE Lot ID	1x	2x	4x	8x	16x
0103	**4,1**	**1,6**	0,9	0,6	0,4
0103/2	**4,1**	**1,7**	0,9	0,6	0,4
0303	**4,0**	**1,6**	0,9	0,5	0,4

2. CITLIVOST

Diagnostická citlivost byla testována na panelu vzorků klasifikovaných jako pozitivní na ověřené soupravě US FDA.
Pozitivní vzorky byly odebrány pacientům s HBV v různých patologických stavech (akutní, chronické) vykazující reaktivitu HBeAg.
U více než 200 vzorků byla naměřena celková hodnota citlivosti > 98%.
Byl použit panel sérokonverze, kód PHM 935B, vydaný BBI. Získaná data jsou uvedena níže v tabulce, byla srovnána s daty získanými ze dvou dalších komerčně dodávaných produktů.

ID vzorku	HBE.CE S/Co	Abbot EIA S/Co	Sorin EIA S/Co
21	5,4	4,5	6,3
22	3,7	4,3	5,4
23	1,9	3,2	3,1
24	1,1	2,4	1,5
25	1,0	2,1	1,2
26	0,6	1,7	0,7
27	0,2	0,8	0,3
28	0,2	0,6	0,2
29	0,2	0,4	0,2
30	0,2	0,3	0,2
31	0,1	0,3	0,2
32	0,1	0,3	0,2

Následně byl testován panel kód PHJ 201 od BBI. Získaná data jsou uvedena níže, byla srovnána s daty získanými od BBI jiného komerčního produktu.

člen	PEI U/ml	HBE.CE	Sorin EIA
1	3	3,3	7,0
2	6	17,5	21,9
3	26	30,1	37,1
4	31	29,4	23,5
5	1	1,1	2,2
6	2	2,3	6,9
7	35	30,1	24,6
8	38	29,2	31,9
9	4	16,6	10,8

10	-	0,3	0,2
11	1	3,4	3,6
12	< 1	0,2	1,2
13	< 1	0,9	1,4
14	-	0,2	0,2
15	-	0,4	0,1
16	-	0,5	0,1
17	-	0,3	0,2
18	-	0,2	0,2
19	-	0,2	0,1
20	-	0,2	0,1
21	-	0,3	1,0
22	-	0,3	0,1
23	-	0,4	0,1
24	-	0,2	0,2
25	-	0,3	0,2

3. SPECIFITA

Diagnostická specifita byla stanovena na panelech negativních vzorků odebraných normálním jedincům a dárcům krve, kteří byli pomocí sady schválené organizací FDA klasifikováni jako negativní.
Pro stanovení přesnosti byla použita jak plazma, připravená různými standardními technikami, tak sérum.
V průběhu testu nebyla pozorována žádná falešná reaktivita.
Byly testovány i zmrazené vzorky ke kontrole, zda interferují s provedením testu. Nebyly pozorovány žádné interference na čistých vzorcích.
Vzorky získané od pacientů s rozdílnou virovou (HCV a HAV) a nevirovou patologií jater mohou interferovat s testem.
Nebyly pozorovány žádné zkřížené reakce. Tento test hodnocený kvalifikovanou referenční laboratoří byl proveden na více než 500 vzorcích a dosáhl hodnoty specifity > 98%.

4. REPRODUKOVATELNOST

Reprodukovatelnost byla testována na dvou vzorcích v 16 replikátech třemi různými testy tří různých šarží.
Zjištěné hodnoty jsou následující:

HBE.CE šarže 0103
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,030	0,027	0,032	0,029
odchylka	0,002	0,002	0,003	0,002
Směrodatná odchylka %	7,4	8,2	7,9	7,8

PEI 1 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,569	0,559	0,575	0,568
Odchylka	0,027	0,029	0,028	0,028
Směrodatná odchylka %	4,7	5,3	4,9	4,9
S/Co	4,4	4,4	4,4	4,4

HBE.CE šarže 0103/2
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,033	0,031	0,030	0,032
Odchylka	0,003	0,003	0,002	0,003
Směrodatná odchylka %	7,9	8,5	7,4	8,0

PEI 1 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,565	0,573	0,568	0,569
Odchylka	0,026	0,025	0,024	0,025
Směrodatná odchylka %	4,7	4,3	4,2	4,4
S/Co	4,2	4,4	4,4	4,3

HBE.CE šarže 0,03
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,029	0,034	0,038	0,034
Odchylka	0,003	0,003	0,004	0,003
Směrodatná odchylka %	9,7	9,8	9,2	9,6

PEI 1 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,579	0,573	0,564	0,572
Odchylka	0,023	0,028	0,025	0,025
Směrodatná odchylka %	4,1	4,8	4,5	4,5
S/Co	4,5	4,3	4,1	4,3

B) HBe protilátky

1. LIMIT DETEKCE

Limit detekce pro analýzu je dán průměrem Mezinárodních standardů pro HBeAg daných Institutem Paula Ehrlicha (PEI).
Data získaná zjišťováním limitu detekce tří šarží jsou v tabulce níže:

HBE.CE Lot ID	PEI U/ml HBeAb
0103	0,25
0103/2	0,25
0303	0,25

Souprava byla testovaná i po vydání Accurun # 52, vytvořenou firmou Boston Biomedica Inc, USA, po ředění v FCS. Výsledky jsou níže:

HBE.CE Lot ID	1x	2x	4x	8x	16x
0103	1,0	0,8	0,6	0,4	0,4
0103/2	1,0	0,8	0,6	0,5	0,4
0303	1,0	0,8	0,6	0,4	0,4

2. CITLIVOST

Diagnostická citlivost byla testována na panelu vzorků klasifikovaných jako pozitivní na HBeAb na ověřené soupravě US FDA.
Pozitivní vzorky byly odebrány pacientům s HBV v různých patologických stavech (akutní, chronické) vykazující reaktivitu HBeAg.
U více než 200 vzorků byla naměřena celková hodnota citlivosti > 98%.
Byl použit panel sérokonverze, kód PHM 935B vydaný BBI. Získaná data jsou uvedena níže v tabulce, byla srovnána s daty získanými ze dvou dalších komerčně dodávaných produktů.

ID vzorku	HBE.CE S/Co	Abbot EIA S/Co	Sorin EIA S/Co
21	0,4	0,4	0,5
22	0,4	0,5	0,6
23	0,4	0,6	0,5
24	0,4	0,5	0,6
25	0,4	0,6	0,5
26	0,5	0,6	0,6
27	0,6	0,8	0,7
28	0,7	0,9	0,7
29	0,6	0,9	0,7
30	0,8	1,0	0,9
31	1,0	1,3	1,1
32	1,0	1,2	1,0

Následně byl testován panel kód PHJ 201 od BBI. Získaná data jsou uvedena níže, byla srovnána s daty získanými od BBI jiného komerčního produktu.

člen	PEI U/ml	HBE.CE	Sorin EIA
1	-	0,3	0,5
2	-	0,2	0,5
3	-	0,2	0,5
4	-	0,2	0,5
5	-	0,3	0,6
6	-	0,3	0,6
7	-	0,2	0,4
8	-	0,2	0,4
9	-	0,2	0,5
10	-	1,9	0,6
11	-	0,3	0,5
12	-	0,4	0,9
13	2	4,4	9,1
14	1	3,8	2,9
15	< 1	1,0	1,5
16	> 50	4,3	120,9
17	< 1	1,0	1,0
18	5	5,6	21,8
19	1	2,7	6,4
20	11	5,0	47,3
21	2	1,9	10,0
22	26	28,1	90,7
23	-	0,3	0,5
24	< 1	0,8	1,3
25	50	28,1	167,4

3. SPECIFITA

Klinická specifita byla zjišťována, jako je popsáno u HBeAg.
Tento test hodnocený kvalifikovanou referenční laboratoří byl proveden na více než 500 vzorcích a dosáhl hodnoty specifity > 98%.

4. REPRODUKOVATELNOST

Reprodukovatelnost byla testována na dvou vzorcích v 16 replikátech třemi různými testy tří různých šarží.
Zjištěné hodnoty jsou následující:

HBE.CE šarže 0103
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	2,484	2,420	2,471	2,458
odchylka	0,129	0,160	0,142	0,144
Směrodatná odchylka %	5,2	6,6	5,7	5,9

PEI 0,25 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,867	0,800	0,878	0,848
Odchylka	0,043	0,060	0,050	0,051
Směrodatná odchylka %	5,0	7,5	5,7	6,1
S/Co	1,0	1,0	1,0	1,0

HBE.CE šarže 0103/2
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	2,316	2,361	2,413	2,363
Odchylka	0,127	0,144	0,146	0,139
Směrodatná odchylka %	5,5	6,1	6,0	5,9

PEI 0,25 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	1.běh	2.běh	3.běh	Průměr
OD450nm	0,767	0,793	0,785	0,781
Odchylka	0,041	0,050	0,046	0,046
Směrodatná odchylka %	5,4	6,3	5,8	5,8
S/Co	1,0	1,0	1,0	1,0

HBE.CE šarže 0,03
Negativní kontrola (N=16)

Průměrná hodnota	**1.běh**	**2.běh**	**3.běh**	**Průměr**
OD450nm	2,334	2,415	2,437	2,395
Odchylka	0,146	0,155	0,158	0,153
Směrodatná odchylka %	6,3	6,4	6,5	6,4

PEI 0,25 U/ml (N=16)

Průměrná hodnota	**1.běh**	**2.běh**	**3.běh**	**Průměr**
OD450nm	0,850	0,867	0,876	0,864
Odchylka	0,052	0,051	0,048	0,050
Směrodatná odchylka %	6,1	5,9	5,5	5,8
S/Co	0,9	1,0	1,0	1,0

S. OMEZENÍ

Zmrazené vzorky obsahující fibrinové částice nebo agregáty mohou poskytnout falešně pozitivní výsledky.
Bakteriální kontaminace nebo tepelná inaktivace vzorku může ovlivnit hodnoty absorbance v důsledku změny koncentrace analytu.
Tento test je vhodný pouze pro testování jednotlivých vzorků.
Diagnóza infekční nemoci by neměla být stanovena na základě pouhého výsledku vyšetření. Měl by být brán v úvahu klinický stav pacienta, symptomy i diagnostická data.

T. LITERATURA

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. Snydman 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. Ling C.M., Mushawar I.K. et al.. Infection and Immunity, 24: 235, 1979.
11. Mushawar I.K., Overby L.R. et al.. J.Med.Virol..2: 77, 1978
12. Aldershville J., Frosner G.G. et al.. J.Med.Dis., 141: 293, 1980
13. Magnius L.O., Lindhom A. et al.. J.Am.Med.Assoc., 231: 356, 1975
Krugman S., Overby L.R. et al.. N.Engl.J.Med.. 300: 101, 1979

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 HBE.CE	Rev.: 0	2010/04ES

Distributor:
LABOSERV s.r.o.
Hudcova 532/78b, 612 00 Brno
Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114
e-mail: laboserv@laboserv.cz
www.laboserv.cz