

# HBsAg<sub>one</sub>

**Enzymatický jednofázový test třetí generace  
(ELISA) pro určení přítomností antigenů  
Hepatitis B v plazmě a krevním séru.**

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](mailto:diapro@tin.it)

REF SAG1.CE  
96/192/480/960 testů

## HBsAg One-Step

### POUŽITÍ

Enzymatický jednofázový test třetí generace (ELISA) pro určení přítomnosti antigenů Hepatitis B v plazmě a krevním séru.

Pouze pro diagnostiku "in vitro".

### ÚVOD

Povrchový antigen Hepatitis B neboli HBsAg je nejdůležitější obalový protein viru Hepatitis B zodpovědného za akutní a chronickou virovou hepatitidu.

Tento povrchový antigen obsahuje determinant "a", společný pro všechny známé podtypy viru, které imunologicky dělíme do dvou odlišných skupin ("ay" a "ad").

Z hlavních forem virové hepatitidy, virus HBV je zodpovědný za nejčastější nemoc přenášenou transfúzí. Vyvolává řadu klinických příznaků, které sahají od mírné nejasné hepatitidy po prudkou hepatitidu, vážné chronické onemocnění jater a cirhózu. HBV se také podílí na vzniku primárního hepatocelulárního karcinomu.

Schopnost detekovat HbsAg vedla v posledních letech k pochopení jeho šíření po světě a k radikálnímu snížení rizika přenosu infekce transfúzí.

### PRINCIP EIA TESTU

Monoklonální protilátka specifická pro HBsAg je fixovaná na povrch mikrojamek. Do mikrojamky se přidá sérum nebo plasma pacienta spolu s druhou monoklonální protilátkou proti jinému epitopu konjugovanou peroxidázou (HRP). Tento specifický imunokomplex, který se ve vzorku zformuje v případě přítomnosti HBsAg se zachytí na pevné fázi.

Na konci této jednofázové inkubace se mikrojamky promyjí, aby se odstranily nenavázané proteiny séra a konjugát HRP.

Poté se přidá chromogen a substrát. Pokud je ve vzorku přítomen imunokomplex HBsAg, bezbarvý substrát se hydrolyzuje navázaným konjugátem HRP na zbarvený konečný produkt, který se měří readerem ELISA.

Intenzita barvy je přímo úměrná množství HBsAg ve vzorku.

### OBSAH SOUPRAVY

Každá sada obsahuje dostatečné množství reagentů na provedení 96 testů.

### Mikrodestička pokrytá protilátkou: MICROPLATE

12 stripů s 8 jamkami potažených purifikovanou protilátkou specifickou pro HBsAg zatavená do sáčku s vysoušečem.

Před otevřením sáčku nechte 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 koží sérum; 10 mM fosfátový pufr o pH 7.4+/-0.1; 0.09% azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans. Negativní kontrola je označena bledě žlutou barvou.

### Pozitivní kontrolní vzorek: CONTROL +

1x2 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje koží sérum, neinfekční rekombinantní proteiny HBsAg, 10 mM fosfátový pufr o pH 7.4+/-0.1; 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC jako konzervans. Pozitivní kontrola je označena zelenou barvou.

### Kalibrátor: CAL ....

Obsahuje kraví sérum a neinfekční rekombinantní proteiny HBsAg v koncentraci 0,5 IU/ml (2. WHO mezinárodní standard pro HBsAg), 10 mM fosfátový pufr o pH 7.4+/-0.1; 0.02% gentamycin sulfátu 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 fosfátový pufr o pH 7.0+/-0.2; 0.05% Tween 20 a 0.1% Kathon GC.

### Roztok na ředění Enzymatického konjugátu:

#### CONJ DIL

1x16 ml. Připraveno k přímému použití. 1 % normálního myšního séra, 10 mM Tris pufr o pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC. Označeno červenou barvou.

### Enzymatický konjugát: CONJ 20X

1x0,8 ml. 20ti násobný koncentrát. Obsahuje s peroxidázou konjugované myší monoklonální protilátky pro HBsAg, 10 mM Tris pufr o pH 6.8+/-0.1, 5% BSA, 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC.

### Chromogen: SUBS TMB

1x25 ml. Obsahuje 50 mM citrát-fosfátový pufr o pH 3.5-3.8; 4% DMSO; 0.03% tetramethylbenzidin (TMB) a 0.02% peroxidu vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Poznámka: Skladujte v temnu.*

### Stop roztok: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3 M

1x15ml, lahvička obsahuje 0.3 M roztok kyseliny sírové H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Pozor: Zabraňte kontaktu s očima a pokožkou. Dráždivá látka - Xi R36/38, S2/26/30.*

## Krycí fólie na mikrotitrační destičku.

### Instrukční manuál

#### POTŘEBNÝ MATERIÁL NEDODÁVANÝ SE SOUPAVOU

1. Mikropipety a jednorázové špičky
2. Voda odpovídající normě EIA.
3. Stopky s rozsahem 60 minut.
4. Savý papír.
5. Termostatický inkubátor mikrotitračních destiček nastavený na +37°C
6. Reader s filtry 450nm a 620-630nm.
7. Promývačka mikrotitračních destiček
8. Vortex

#### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Se soupravou smí pracovat pouze vyškolený personál pod dohledem doktora medicíny, 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 vakcinován proti HAV a HBV, a to vakcinami 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 °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°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.

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. Nebyl pozorován vliv citrátu, EDTA ani heparinu.

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°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.

Pokud jsou přítomny částice, odstřed'te vzorek při 2000 RPM po dobu 20 minut nebo jej filtrujte použitím filtru 0.2-0.8 µm až do vyčistění vzorku.

## PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A UPOZORNĚNÍ

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

### 1. Mikrotitrační destička:

Nechejte 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 zelená.

### 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. Pozitivní kontroly neobsahují infekční HBV, jelikož se skládá z rekombinantních syntetických HBsAg.

### 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.

### 6. Enzymatický konjugát:

Pracovní roztok je třeba připravit. Enzymatický konjugát se 20x naředí přiloženým roztokem. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. Buďte opatrní, nekontaminujte tekutinu oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Pokud je tato reagentie přenášena, pak ať přenášena pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

*Poznámka: Připravte si jen potřebné množství roztoku, jelikož připravený roztok není stabilní.*

### 8. 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.

### 9. 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. V případě, že během inkubace zároveň vzorky třepete, doporučuje se využít 350 rpm. Velmi důležitá je amplituda třepání, je třeba dát pozor, aby se vzorky nedostaly z jamek, což může způsobit falešně pozitivní výsledek.

4. 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.

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

6. 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.

7. 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 možností křížové kontaminace při opakované dispensaci jehlou automatu. Používání ELISA automatu je doporučeno, pokud počet vzorků v jednom běhu je nejméně 30.

8. 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. 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. Nařed'te si potřebný objem koncentrátu promývacího roztoku, jak je popsáno výše.
4. Nařed'te si konjugát ředícím roztokem.
5. Rozpus'te kalibrátor, jak je popsáno výše a jemně promíchejte na vortexu.
6. Ponechte všechny ostatní komponenty soupravy vytemperovat na pokojovou teplotu (asi jednu hodinu) a pak jemně promixujte na vortexu všechny tekuté reagenty.
7. 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.
8. Zkontrolujte, zda je zapnutý ELISA reader anebo se ujistěte, že bude zapnut minimálně 20 min před měřením.
9. Pokud používáte automat, zapněte ho, zkontrolujte nastavení a ujistěte se, že používáte správný protokol.
10. Zkontrolujte, zda jsou mikropipety nastaveny na požadovaný objem.
11. Zkontrolujte, zda je všechno ostatní vybavení k dispozici a připraveno k použití.
12. V případě nějakých problémů, nepokračujte dále se zpracováním testu a poraďte 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.

### Test na analyzátoru:

V případě, že test se provádíte na ELISA automatu, navrhujeme nejprve pipetovat 150 µl kontroly a kalibrátoru, poté všechny vzorky a nakonec 100 µl naředěného konjugátu.

Před nasátím dalšího vzorku je třeba důkladně omýt jehly, abychom se vyhnuli vzájemnému znečištění mezi vzorky nebo špičkami, které mají být vyměněny.

Následuje předmytí (bod 1), u dalších operací se řiďte provozními pokyny popsanými níže pro manuální test.

Důrazně doporučujeme zkontrolovat, že časový překryv mezi dávkováním prvního a posledního vzorku bude vzat v úvahu a odpovídajícím způsobem bude posunuto první promývání.

### Manuální test:

1. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku a omyjte je, aby byl povrch jamek hydratovaný.

*Poznámka: Pre mytí je zásadní pro získání spolehlivých a konkrétních výsledků jak u manuálního tak automatického postupu. Nevynechávat!*

2. První jamku A1 ponechte prázdnou pro slepý test (BLANK).

3. Dávkujte 150 µl negativní kontroly v triplicátu, 150 µl kalibrátoru v duplikátu a 150 µl pozitivní kontroly do jedné jamky, pak 150 µl předředených vzorků do jednotlivých jamek.

4. Přidejte 100 µl zředěného konjugátu do každé jamky s výjimkou A1.

*Poznámka: Buďte opatrní, aby nedocházelo ke styku špičky s povrchem jamky. Může dojít ke kontaminaci.*

5. Zkontrolujte, že vzorky byly umístěny správně. Inkubujte destičku **120 minut při +37°C**

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

*Jestliže využíváte třepačku, nezapomeňte dodržet výše popsané otáčky, aby nenastala kontaminace.*

6. Promyjte na automatické promývačce pomocí promývacího roztoku, jak bylo popsáno výše.

7. Přidejte 200 µl substrátu do každé jamky, včetně jamky A1. Inkubujte mikrotitrační destičku **při pokojové teplotě (18-24°C) po dobu 30 minut.**

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

8. Pipetujte 100 µl Stop roztoku do každé jamky ve stejném sledu jako v předchozích bodech. Změřte intenzitu zabarvení roztoků jamek ELISA readerem při 450 nm pro odečet pozadí i při 620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

### Důležité poznámky:

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.

3. Pokud testované vzorky nejsou zcela čisté nebo byly zmrazeny, postupujte podle níže uvedeného schématu, které je daleko méně citlivé na interference způsobené hemolyzovanými a hyperlipemickými vzorky, stejně jako vzorky obsahujícími rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic. Test se provádí ve dvou krocích s využitím inkubované třepačky.

- dávkuje 100 µl kontrol, kalibrátoru a vzorků
- inkubujte 60 minut při +37°C na třepačce
- promytí
- dávkuje 100 µl zředěného konjugátu
- inkubujte 30 minut při +37°C na třepačce
- promytí
- dávkuje 100 µl TMB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mix
- inkubujte 30 minut při 18-24°C na třepačce
- zastavení reakce a vyhodnocení

V tomto postupu před-mytí může být vynecháno.  
Tato metoda vykazuje podobné výsledky, takže může být alternativně využita.

## SCHÉMA POSTUPU

|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Před-mytí                                | 1 cyklus       |
| kontrolní vzorky a vzorky                | 150 µl         |
| ředící roztok                            | 100 µl         |
| <b>1. inkubace</b>                       | <b>120 min</b> |
| teplota                                  | +37°C          |
| promytí                                  | 4-5 cyklů      |
| směs TMB a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 200 µl         |
| <b>3. inkubace</b>                       | <b>30 min</b>  |
| 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) | < 0,100 OD 450 nm               |
| negativní kontrola (NC)      | < 0,050 OD 450 nm po vynulování |
| kalibrátor                   | S/Co ≥ 2                        |
| pozitivní kontrola (PC)      | > 1,000 OD 450 nm               |

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

| Problém                                               | Zkontrolujte                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Blank</b><br>OD > 0.100                            | 1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>Negativní kontrola</b><br>OD > 0,050 po blankování | 1. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku<br>2. zda byl použit správný promývací roztok a zda jim byla promývačka naplněna před použitím<br>3. zda nebyla udělána chyba při pipetování kontrol (pozitivní kontroly místo negativní)<br>4. zda nedošlo ke kontaminaci NC nebo jamek, do nichž byla NC napipetována pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu<br>5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem<br>6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpány |
| <b>Kalibrátor</b><br>S/Co < 2                         | 1. zda byl dodržen pracovní postup<br>2. zda nebyla udělána chyba při pipetování kalibrátoru<br>3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku<br>4. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Pozitivní kontrola</b><br>OD < 1.000               | 1. zda byl dodržen pracovní postup<br>2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. napipetování negativní kontroly místo pozitivní)<br>3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku<br>5. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly.                                                                                                                                                                                                                                            |

## VÝSLEDKY

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

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0,050$$

## 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 |
|-----------|--------------|
| < 0.9     | Negativní    |
| 0.9 – 1.1 | Hraniční     |
| > 1.1     | Pozitivní    |

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

U pacienta s dubiozním 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.

## PARAMETRY TESTU

### 1. CITLIVOST:

Citlivost testu byla vypočtena pomocí mezinárodního standardu pro HBsAg, podtyp ay, dodané Institutem Paula Erlicha a NIBSC.

Tento test vykazuje průměrnou citlivost asi **0,02 PEIU/ml** a asi **0,125 ng/ml NIBSC jj**.

Tato data byla potvrzena tabulkami firmy Boston Biomedica Inc. pro HBsAg.

Zde níže jsou uvedeny dva panely dodané firmou Boston Biomedica Inc. tak, jak byly testovány touto testovací sadou s použitím postupu C.

**Boston Biomedica Inc.**  
**Panel PHA 104**  
**HBsAg low titer Performance Panel**

| vzorek<br>ID n° | HBsAg<br>ng/ml * | Abbott<br>EIA std ** | Ortho<br>EIA std ** | Sada       |
|-----------------|------------------|----------------------|---------------------|------------|
|                 |                  | s/co                 | s/co                | s/co       |
| 104-01          | 0,8              | <b>2,1</b>           | <b>2,3</b>          | <b>2,7</b> |
| 104-02          | 2,2              | <b>4,6</b>           | <b>5,4</b>          | <b>7,6</b> |
| 104-03          | 0,6              | <b>1,5</b>           | <b>1,3</b>          | <b>2,4</b> |
| 104-04          | 0,2              | 0,6                  | 0,3                 | 0,2        |
| 104-05          | 0,7              | <b>1,7</b>           | <b>2,1</b>          | <b>1,5</b> |
| 104-06          | 1,3              | <b>2,7</b>           | <b>3,3</b>          | <b>2,9</b> |
| 104-07          | 0,3              | <b>1,0</b>           | 0,6                 | <b>1,0</b> |
| 104-08          | 1,6              | <b>3,6</b>           | <b>4,9</b>          | <b>4,4</b> |
| 104-09          | 0,9              | <b>1,5</b>           | <b>1,2</b>          | <b>1,7</b> |
| 104-10          | 0,0              | 0,1                  | 0,2                 | 0,2        |
| 104-11          | 0,3              | 0,9                  | 0,8                 | <b>1,1</b> |
| 104-12          | 1,7              | <b>3,9</b>           | <b>4,9</b>          | <b>3,6</b> |
| 104-13          | 0,8              | <b>1,7</b>           | <b>1,6</b>          | <b>2,3</b> |
| 104-14          | 0,6              | <b>1,4</b>           | <b>2,3</b>          | <b>1,4</b> |
| 104-15          | 1,1              | <b>2,9</b>           | <b>2,3</b>          | <b>2,6</b> |

\* BBI ng/ml

\*\* procedura provedena přes noc

**Boston Biomedica Inc.**  
**Panel PHA 805**  
**HBsAg Sensitivity Panel**

| PHA 805<br>Boston<br>B.I.<br>ID. | HBV<br>HBsAg<br>viral | kalibrováno<br>BBI<br>PHA804 | kalibrováno<br>Abbott<br>Panel | kalibrováno<br>PEI<br>standard | KIT        |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|
| Vzorek                           | Podtyp                | ng/ml                        | ng/ml                          | E/ml                           | S/Co       |
| 1                                | Ad                    | 2,50                         | 3,00                           | 0,36                           | <b>8.0</b> |
| 2                                | Ad                    | 1,40                         | 1,70                           | 0,21                           | <b>3.7</b> |
| 3                                | Ad                    | 1,00                         | 1,20                           | 0,15                           | <b>2.8</b> |
| 4                                | Ad                    | 0,80                         | 0,90                           | 0,12                           | <b>2.3</b> |
| 5                                | Ad                    | 0,60                         | 0,70                           | 0,09                           | <b>2.2</b> |
| 6                                | Ad                    | 0,50                         | 0,60                           | 0,07                           | <b>1.4</b> |
| 7                                | Ad                    | 0,40                         | 0,50                           | 0,06                           | <b>1.3</b> |
| 8                                | Ad                    | 0,30                         | 0,40                           | 0,04                           | <b>1.1</b> |
| 9                                | Ad                    | 0,20                         | 0,20                           | 0,03                           | <b>0.9</b> |
| 10                               | Ad                    | 0,10                         | 0,10                           | 0,01                           | <b>0.4</b> |
| 11                               | Ay                    | 2,40                         | 1,80                           | 0,21                           | <b>6.0</b> |
| 12                               | Ay                    | 1,30                         | 1,00                           | 0,11                           | <b>3.5</b> |
| 13                               | Ay                    | 1,10                         | 0,80                           | 0,09                           | <b>2.8</b> |
| 14                               | Ay                    | 1,00                         | 0,70                           | 0,08                           | <b>3.0</b> |
| 15                               | Ay                    | 0,70                         | 0,50                           | 0,06                           | <b>2.1</b> |
| 16                               | Ay                    | 0,50                         | 0,40                           | 0,04                           | <b>1.8</b> |
| 17                               | Ay                    | 0,40                         | 0,30                           | 0,03                           | <b>1.7</b> |
| 18                               | Ay                    | 0,30                         | 0,20                           | 0,03                           | <b>1.3</b> |
| 19                               | Ay                    | 0,20                         | 0,20                           | 0,02                           | <b>1.0</b> |
| 20                               | Ay                    | 0,10                         | 0,10                           | 0,01                           | <b>0.8</b> |
| 21                               | negative              | 0,00                         | 0,00                           | 0,00                           | <b>0.3</b> |

### 2. PŘESNOST:

Přesnost byla stanovena na panelech negativních vzorků od normálních jedinců a dárců krve, předem negativně klasifikovaných pomocí testovací sady schválené institutem FDA.

Ke stanovení hodnot přesnosti bylo použito jak plazmy, tak séra získaných různými standardními technikami přípravy.

Aby se otestovaly interference způsobené odběrem a skladováním, byly použity také zmrazené vzorky.

Tato sada pro analýzu vykazuje více než 99% přesnost pro plazmu a sérum.

Byly testovány všechny známé podtypy viru HBsAg, "ay" a "ad", a také isoformy "w" a "r", dodané CNTS – France, a v dodaných koncentracích byly rozlišeny jako pozitivní.

### 3. REPRODUKOVATELNOST:

Reprodukovatelnost byla vypočtena na třech vzorcích různými sériemi.

Byly nalezeny následující průměrné hodnoty:

Negativní: prům. OD450nm 0,030

prům. CV 15%

Koeficient: prům. OD450nm 0,100

prům. CV 7%

Pozitivní: prům. OD450nm 2,900

prům. CV 4%

Byly opakovaně testovány tři různé vzorky při různých hodnotách OD450nm, v různé dny a s různými šaržemi testů. V následujících tabulkách je uvedeno shrnutí výsledků CV:

#### Intra-assay

|     | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 |
|-----|----------|----------|----------|----------|
| 1   | 0.791    | 0.511    | 0.229    | 1.414    |
| 2   | 0.794    | 0.523    | 0.229    | 1.418    |
| 3   | 0.800    | 0.515    | 0.229    | 1.403    |
| 4   | 0.790    | 0.507    | 0.233    | 1.400    |
| 5   | 0.780    | 0.530    | 0.239    | 1.430    |
| 6   | 0.780    | 0.535    | 0.240    | 1.440    |
| 7   | 0.782    | 0.550    | 0.243    | 1.446    |
| 8   | 0.806    | 0.570    | 0.235    | 1.400    |
| 9   | 0.800    | 0.530    | 0.245    | 1.450    |
| 10  | 0.810    | 0.540    | 0.250    | 1.456    |
| SD  | 0.010    | 0.019    | 0.007    | 0.021    |
| %CV | 1.3      | 3.5      | 3.1      | 1.5      |

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

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

|       |             |          |       |
|-------|-------------|----------|-------|
| Doc.: | INS SAG1.CE | Verze: 5 | 06/06 |
|-------|-------------|----------|-------|

#### Inter-assay

|     | Sample 1 | Sample 2 | Sample 3 |
|-----|----------|----------|----------|
| 1   | 0.442    | 0.714    | 1.400    |
| 2   | 0.407    | 0.705    | 1.405    |
| 3   | 0.500    | 0.730    | 1.414    |
| 4   | 0.476    | 0.723    | 1.410    |
| 5   | 0.483    | 0.714    | 1.440    |
| 6   | 0.484    | 0.670    | 1.413    |
| 7   | 0.440    | 0.703    | 1.393    |
| 8   | 0.490    | 0.760    | 1.353    |
| 9   | 0.456    | 0.740    | 1.350    |
| 10  | 0.476    | 0.710    | 1.206    |
| 11  | 0.450    | 0.739    | 1.271    |
| 12  | 0.530    | 0.680    | 1.205    |
| 13  | 0.474    | 0.695    | 1.025    |
| 14  | 0.498    | 0.690    | 1.250    |
| 15  | 0.454    | 0.702    | 1.155    |
| 16  | 0.465    | 0.704    | 1.153    |
| 17  | 0.440    | 0.690    | 1.323    |
| 18  | 0.470    | 0.670    | 1.153    |
| SD  | 0.028    | 0.024    | 0.122    |
| %CV | 6.0      | 3.4      | 9.4      |

#### Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

e-mail: [laboserv@laboserv.cz](mailto:laboserv@laboserv.cz)

#### ODBORNÁ LITERATURA

1. Aach R.D., Grisham J.W., Parker S.W.. Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc.Natl.Acad.Sci..USA, 68:1956, 1971.
2. Blumerg B.S., Suinick A.I., London W.T.. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. Bull.N.Y.Acad.Med.. 44:1566, 1968.
3. Boniolo A., Dovis M., Matteja R.. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for screening hybridoma antibodies against hepatitis B surface antigen. J.Immunol.Meth.. 49:1, 1982.
4. Caldwell C.W., Barpet J.T.. Enzyme immunoassay for hepatitis B and its comparison to other methods. Cli.Chim.Acta 81: 305, 1977
5. Fazekas S., De St.Groth, Scheidegger D.. production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. J.Immunol.Meth.. 35: 1, 1980
6. Reesink H.W.. et al.. Comparison of six 3<sup>rd</sup> generation tests for the detection of HBsAg. Vox.Sang.. 39:61, 1980
7. Rook G.A.W.. Chromogens for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using horseradish peroxidase. Lepr.Rev. 52: 281, 1981
8. Schroder J.. Monoclonal antibodies: a new tool for reasearch and immunodiagnostic. Med.Biol.. 58: 281, 1981