

ELISA souprava - HEV Ab

A. POUŽITÍ

ELISA třetí generace pro kvalitativní stanovení obsahu protilátek proti viru Hepatitidy E v lidském séru a plazmě. Tato souprava se používá pro testování krevních vzorků a následné sledování HEV pozitivních pacientů. Pouze pro diagnostické použití "in vitro"

B. ÚVOD

Virus hepatitidy E neboli HEV je nedávno objevené agens způsobující střevně přenosnou virovou hepatitidu. HEV je neopouzdřený jednovláknový RNA virus strukturálně podobný kalciviru, který se nalézá ve stolici nakažených pacientů.

HEV představuje v mnoha rozvojových zemích vážný problém a jeho první propuknutí bylo zjištěno v roce 1955 v New Delhi v Indii. Hepatitida E nikdy nebyla spojována s chronickou infekcí, avšak u těhotných žen představuje častou příčinu úmrtnosti.

Klonování a sekvenování HEV genomu vedlo k vývoji sérologických testů k detekci HEV protilátek.

Tento test je založen na syntetických imunodominantních antigenech získaných z konzervativních oblastí viru.

C. PRINCIP TESTU

Stěny jamek stripu jsou potaženy HEV specifickými syntetickými antigeny kódujícími imunodominantní determinanty derivované z mexických a barských kmenů viru.

Na pevnou fázi se nejprve aplikuje zředěný vzorek a HEV protilátky se, pokud jsou přítomny, naváží na antigeny.

Po odmytí všech ostatních komponentů vzorku jsou HEV protilátky (IgG i IgM), navázané během druhé inkubace, detekovány přidáním polyklonálních specifických antilidských IgG a IgM protilátek značených HRP.

Tento enzym navázaný na pevnou fázi, reagující v systému substrátu a chromogenu, generuje optický signál, jehož intenzita je přímo úměrná množství HEV protilátek přítomných ve vzorku. Pomocí koeficientu lze interpretovat hodnoty optické hustoty jako negativní nebo pozitivní výsledky.

D. DODÁVANÉ MATERIÁLY

Souprava EVAB.CE obsahuje reagentie pro 96 testů

1. Mikrotitrační destička [MICROPLATE] - 1ks
12 stripů po 8 jamkách potažených HEV specifickými syntetickými antigeny. Stripy jsou vakuově zabaleny ve fólii s desikantem.

2. Negativní kontrolní vzorek [CONTROL -] - 1 x 2ml
Kontrolní vzorek k okamžitému použití. Obsahuje 1 % proteinů kozího séra, 10mM pufovaný roztok citrátu sodného pH 6,0 +/-0,1, 0,5 % Tweenu 20, 0,09 % azidu sodného a 0,1 % Kathonu GC jako konzervantu. Negativní kontrolní vzorek je označen olivově zelenou barvou.

3. Pozitivní kontrolní vzorek [CONTROL +] 1 x 2ml
Kontrolní vzorek k okamžitému použití. Obsahuje 1 % proteinů kozího séra, HEV pozitivní lidské protilátky, 10 mM pufovaný roztok citrátu sodného pH 6,0 +/-0,1, 0,5 % Tweenu 20, 0,09 % azidu sodného a 0,1 % Kathonu GC jako konzervantu. Pozitivní kontrolní vzorek je označen tmavě zelenou barvou.

4. Kalibrátor [CAL...] 1 ampule
Lyofilizovaný kalibrátor. Je třeba rozředit redestilovanou vodou v objemu dle nálepky. Obsahuje proteiny fetálního bovinního séra, lidské protilátky proti HEV, jejichž obsah je kalibrován dle první normy WHO pro HEV protilátky, kód NIBSC 95/584, 10mM pufovaný roztok citrátu sodného pH 6,0 +/-0,1; 0,3 mg/ml gentamicin sulfátu a 0,1 % Kathonu GC jako konzervantů.

Poznámka: Množství vody nutné pro rozředění objemu této ampule se může lišit šarže od šarže. Použijte, prosím, správné množství uvedené na etiketě.

5. Koncentrát promývacího pufru. [WASHBUF 20X] 1x 60ml

20x koncentrovaný roztok. Po rozředění tento promývací roztok obsahuje 10 mM fosfátový pufr pH 7,0+/- 0,2; 0,05 % Tweenu 20 a 0,05 % Kathonu GC.

6. Enzymatický konjugát [CONJ] 1x 16ml
K okamžitému použití, označen červenou barvou. Obsahuje kozí polyklonální protilátku proti lidskému IgG a IgM značenou HRP, 5 % BSA, 10mM Tris pufr pH 6,8 +/- 0,1; 0,1 % Kathonu GC a 0,02 % gentamicin sulfátu jako konzervanty.

7. Chromogen / Substrát [SUBS TMB] 1x 16 ml
K okamžitému použití. Obsahuje 50mM citrátfosfátový pufr pH 3,5-3,8, 4% dimethylsulfoxidu, 0,03% tetra-methyl-benzidinu neboli TMB a 0,02 % peroxidu vodíku neboli H₂O₂.

Poznámka: Skladujte v temnu, látka je citlivá na světlo.

8. Ředící roztok [DILAS] 1x 8ml

10 mM tris pufr pH 8.0 +/-0,1 obsahující 0,1 % Kathonu GC pro předředění vzorků a kontrolních vzorků na stripech, pro zamezení interference.

9. Kyselina sírová [H₂SO₄ 0,3 M] 1x 15 ml

Obsahuje 0,3M roztok H₂SO₄.

Pozor: dráždivá látka (Xi R36/38; S2/26/30)

10. Roztok pro ředění vzorků [DILSPE] 1 x 50 ml
Obsahuje 10mM pufovaný roztok citrátu sodného pH 6,0 +/-0,1; 0,5% Tweenu 20; 0,09 % azidu sodného a 0,1 % Kathonu GC jako konzervantů. Používá se pro ředění vzorků.

Poznámka: při ředění vzorku tento roztok mění barvu z olivově zelené po tmavě zelenou.

11. Fólie na krytí stripů 2 ks

12. Příbalový leták 1 ks

E. MATERIÁL NEDODÁVANÝ V SOUPRAVĚ

1. Kalibrované mikropipety (200 μ l a 10 μ l) a jednorázové špičky.
2. Redestilovaná nebo deionizovaná voda, filtrovaná přes aktivní uhlí k odstranění oxidačních činidel použitých jako desinfekční prostředky.
3. Stopky.
4. Savý papír.
5. Kalibrováný temperovaný inkubátor pro ELISA destičky s teplotou +37°C.
6. Kalibrováný ELISA reader s filtry 450 nm (na čtení) a 620-630 nm (na nulování).
7. Kalibrována promývačka mikrotitračních destiček.
8. Vortex nebo podobné mísicí zařízení.

F. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Tato souprava smí být používána pouze řádně vyškoleným personálem pod dohledem lékaře zodpovídajícího za laboratoř.
2. Pokud se tato souprava používá pro testování krevních vzorků a komponent, musí být používána laboratoří certifikovanou a kvalifikovanou státním úřadem pro příslušný resort (ministerstvo zdravotnictví nebo podobný orgán) pro provádění rozborů tohoto druhu.
3. Veškerý personál provádějící rozbor musí používat ochranný laboratorní oděv, rukavice a ochranné brýle bez klouzku. Je nutno se vyhnout použití jakýchkoli ostrých (jehly) nebo řezných (skalpely) nástrojů. Veškerý personál musí prodělat školení bezpečnosti práce, dle doporučení Center for Disease Control, Atlanta, U.S. a uvedených v publikaci National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Veškerý personál pracující se vzorky musí být očkován dostupnou, bezpečnou a efektivní vakcínou proti HBV a HAV.
5. Prostředí laboratoře musí být kontrolováno, aby se po otevření obalů mikrotitračních destičky a ampulí ze soupravy a při provádění testu zabránilo kontaminaci prachem nebo vzduchem přenosnými mikrobiálními agens. Ampulí Chromogen/Substrát chraňte před silným světlem a zabraňte vibracím na povrchu pracovní plochy, na které se provádí test.

6. Skladujte sadu při teplotě 2 – 8°C v kontrolované ledničce nebo chladné místnosti, dle návodu.

7. Nezaměňujte komponenty z různých šarží. Doporučujeme, aby nebyly zaměňovány ani komponenty z různých sad.

8. Zkontrolujte, zda jsou reagenty čiré a zde neobsahují žádné viditelné těžké částice nebo sraženiny. Pokud dozor laboratoře nenařídí výměnu soupravy.

9. Zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky séra nebo plazmy použitím jednorázových špiček a jejich výměnou pro použití pro každý vzorek.

10. Zabraňte křížové kontaminaci mezi reagenty soupravy použitím jednorázových špiček a jejich výměnou pro použití pro každý vzorek.

11. Nepoužívejte soupravu po vypršení expirační doby vedené na obalu a na nálepece.

12. Se všemi vzorky zacházejte jako s potenciálně infekčními materiály. Se všemi vzorky lidského séra podle normy Biosafety Level 2, jak ji doporučuje Center for Disease Control, Atlanta, U.S. v souladu s publikací Institutes of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984

13. Pro přípravu kapalných komponent a pro přemísťování komponent do automatických zařízení doporučujeme použití jednorázového plastového materiálu. Zabráníte tím křížové kontaminaci.

14. Odpad zbývající po použití soupravy musí být zlikvidován v souladu s předpisy a zákony o chemickém a biologickém odpadu z laboratoří. Konkrétně s odpadem po promývání, a se zbytky kontrolních vzorků a vzorků pacientů musí být nakládáno jako s potenciálně infekčním materiálem a před likvidací musí být deaktivováno. Doporučený postup deaktivace je aplikace 10% koncentrace domácího desinfekčního prostředku po dobu 16 až 18 hodin nebo deaktivace v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 20 minut.

15. Omylem rozlitá kapalina ze vzorků a při testovacích operacích musí být odsáta filtračním papírem napuštěným desinfekčním prostředkem a pak vodou. Filtrační papír pak musí být vyhozen do kontejneru určeného pro odpad z laboratoře.

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

17. Další odpad zbývající po použití soupravy (například špičky použité pro pipetování vzorků, použité stripy) by měly být likvidovány jako potenciálně infekční podle předpisů a zákonů o odpadu z laboratoří.

G. VZORKY: PŘÍPRAVA A DOPORUČENÍ

1. Krev se odebírá asepticky odběrem ze žíly a plazma nebo sérum se připravuje dle standardních postupů pro přípravu vzorků pro klinické laboratorní rozbor. Při přípravě vzorků nebyly zjištěny žádné interference s citrátem, EDTA a heparinem.

2. Vyhněte se přidávání konzervantů do vzorků. Zejména azidu sodného, protože tato sloučenina by ovlivnila enzymatickou aktivitu konjugátu a způsobila falešně negativní výsledky.

3. Vzorky musí být jasně identifikovány kódy nebo jmény, aby se zabránilo chybné interpretaci výsledků. Když se tato souprava používá pro vyšetřování vzorků krve, doporučuje se používat značení čárovým kódem a jeho elektronické snímání.

4. Hemolyzované (červené) a viditelně hyperlipemické ("mléčné") vzorky musí být zlikvidovány, protože mohou dávat chybné výsledky. Vzorky obsahující zbytky fibrinu nebo hrubých částic nebo mikrobiálních vláken by měly být rovněž zlikvidovány, protože mohou dávat chybné výsledky.

5. Sérum a plazma mohou být skladovány při teplotě +2 – 8°C po pět dnů po odběru. Pro delší skladování, až několik měsíců, mohou být uloženy zmrazené na teplotu –20°C. Všechny zmrazené vzorky by neměly být opakovaně zrazovány a rozmrazovány více než jednou, protože to může ve vzorku způsobit výskyt částic, které mohou ovlivnit výsledek testu.

6. Pokud jsou ve vzorku částice, odstředíte vzorek po dobu 20 minut při 2 000 ot/min nebo jej přefiltrujte před filtr 0,2-0,8 µm, abyste pro testování získali čistý vzorek.

H. PŘÍPRAVA KOMPONENTŮ A UPOZORNĚNÍ

Studie provedená na odevřené soupravě neukázala žádnou významnou ztrátu aktivity až po 6 opakovaných použití až do 6 měsíců.

1. Mikrotitrační destičky:

Mikrotitrační destičku nechejte před otevřením sáčku dosáhnout pokojové teploty (asi 1 hodinu). Zkontrolujte, zda vysoušedlo nezměnilo barvu na temně zelenou, což indikuje výrobní defekt. V případě, že ano, volejte zákaznický servis.

Nepoužité stripy musí být uloženy zpět do hliníkového sáčku s dodávaným vysoušedlem, pevně uzavřeny a skladovány při teplotě +2 – +8 °C

Po prvním otevření obalu jsou zbývající stripy stabilní díky indikátor vlhkosti uvnitř sáčku nezmění barvu ze žluté na zelenou.

2. Negativní kontrolní vzorek:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

3. Pozitivní kontrolní vzorek:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. S tímto vzorkem zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem i když HEV, který by eventuálně mohl být ve vzorku přítomen, byl chemicky deaktivován.

4. Kalibrátor:

Lyofilizovaný obsah ampule pečlivě rozřeďte v dávce vody odpovídající EIA, jak je uvedeno na etiketě.

Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

S kalibrátorem zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem i když HEV, který by eventuálně mohl být ve vzorku přítomen, byl chemicky deaktivován.

Poznámka: Kalibrátor není po zředění stabilní. Skladujte po částech při teplotě –20°C.

5. Koncentrát promývacího pufu:

Celý obsah 20x koncentrovaného roztoku musí být rozředěn redestilovanou vodou na objem 1 200 ml a před použitím důkladně promíchán.

Promývací roztok je po naředění stabilní při teplotě +2 až +8°C po dobu jednoho týdne.

Při přípravě se vyhněte zpěnění roztoku, neboť případné bubliny by mohly způsobit nedostatečné promytí jamek.

6. Enzymatický konjugát:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu

Dávejte pozor, abyste roztok nekontaminovali oxidačními sloučeninami, prachem přenášeným vzduchem nebo mikroby. Pokud je třeba konjugát transportovat, používejte k tomu pouze plastové, pokud možno sterilní jednorázové nádoby.

7. Chromogen/Substrát:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu

Dávejte pozor, abyste roztok nekontaminovali oxidačními sloučeninami, prachem přenášeným vzduchem nebo mikroby.

Nevystavujte silnému světlu, oxidačním činidlům a kovovým povrchům.

Pokud je třeba chromogen/substrát transportovat, používejte k tomu pouze plastové, pokud možno sterilní jednorázové nádoby

8. Ředící roztok pro testování:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu

9. Kyselina sírová:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

Pozor: dráždivá látka (Xi R36/38; S2/26/30).

Legenda: R 36/38 = Dráždivé pro oči a pokožku.

S 2/26/30 = Při vniknutí do očí, okamžitě oči promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařské ošetření.

10. Ředící roztok vzorků:

Připraven k okamžitému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

I. ZAŘÍZENÍ A NÁSTROJE POUŽÍVANÉ V KOMBINACI SE SOUPRAVOU

1. Mikropipety musí být kalibrovány tak, aby dávkovaly správné množství požadované pro rozbor a musí procházet pravidelnou dekontaminací (alkohol, 10% roztok domácí desinfekce, medicínální desinfekce) všech částí, které by mohly přijít náhodně do styku se vzorkem. Musí také procházet pravidelnou údržbou, aby ukazovaly přesnost 1 %. Je nutné také provádět pravidelnou dekontaminaci skvrn a zbytků komponent soupravy.

2. Inkubátor ELISA musí být nastaven na teplotu +37°C (s tolerancí +/-0,5°C) a pravidelně kontrolován, aby bylo zajištěno, že bude udržovat správnou teplotu. Za předpokladu, že zařízení je uznáno jako vhodné pro testy ELISA jsou pro inkubaci vhodné jak suché inkubátory, tak inkubátory s vodní lázní.

3. Promývačka ELISA je pro celkové provedení rozboru mimořádně důležité zařízení. Promývačka musí být před použitím pro rutinní laboratorní testy pečlivě prověřena, zde je vhodná pro testy ELISA, a optimalizována s použitím kontrolních vzorků soupravy a referenčních tabulek. Pro zajištění správného očekávaného provedení testu obvykle stačí 4 až 5 promývacích cyklů (1 cyklus = odsátí a dávkování 300 µl na jamku). Mezi cykly se doporučuje 20 – 30sekundová prodleva. Pro nastavení správného počtu cyklů se doporučuje provést testovací rozbor a kontrolními vzorky soupravy a s typickými negativními a pozitivními referenčními vzorky. Výsledné hodnoty se zkontrolují s hodnotami uvedenými níže v části "Vyhodnocení testu" a "Účinnost testu". Podle pokynů výrobce promývačky se musí provádět pravidelná kalibrace dávkovaného množství a údržba (dekontaminace a čištění jehel).

4. Inkubační doba má toleranci +/-5%.

5. ELISA reader musí být vybaven čtecím filtrem o 450 nm a ideálně druhým filtrem (620-630 nm) pro nulování. Jeho standardní účinnost by měla být (a) šířka pásma ≤ 10 nm; (b) rozsah absorbance od 0 do ≥ 2,0 nm; (c) linearita do ≥ 2,0; opakovatelnost ≥ 1 %. Nulování se provádí na jamce označené v části "Postup testu". Optický systém readeru musí být pravidelně kalibrován by se zajistilo, že optická hustota bude správně změřena. Musí procházet pravidelnou údržbou podle pokynů výrobce.

6. Používáte-li automatickou pracovní stanici ELISA musí být všechny automatizované kroky (dávkování, inkubace, promývání, čtení, a zpracování dat) pečlivě nastaveny, kalibrovány, kontrolovány a pravidelně udržovány, aby odpovídaly hodnotám uvedeným v části "Vyhodnocení testu" a "Účinnost testu". Protokol rozboru musí být instalován v operačním systému jednotky a správně nastaven jak pro promývačku, tak pro reader. Navíc musí být správně nastavena a seřizena ta část stanice, která pracuje s kapalinami (dávkování a promývání). Obzvláštní pozornost věnujte zabránění kontaminace jehlami používanými pro dávkování a promývání. Tuto část je třeba pečlivě kontrolovat, aby se minimalizovala možnost kontaminace sousedících jamek. Doporučujeme používat automatickou pracovní stanici ELISA, pokud počet analyzovaných vzorků převyšuje 20 až 30 na jeden test.

7. Aby byl zabezpečen soulad s výše uvedenými požadavky, zákaznický servis firmy Dia.Pro nabízí podporu uživatelům při nastavování a kontrole zařízení používaného v kombinaci se soupravou. Poskytujeme rovněž podporu instalace nových zařízení určených pro práci se soupravou.

L. PŘÍPRAVA ANALÝZY

1. Zkontrolujte datum expirace soupravy vytištěné na krabici. Nepoužívejte prošlé výrobky.

2. Zkontrolujte, zda kapalně komponenty nejsou kontaminovány okem viditelnými částicemi nebo

sraženinami. Zkontrolujte zda je obsah ampule Chromogen / Substrát bezbarvý nebo světle modrý tím, že odsajete malé množství kapaliny pomocí sterilní průhledné pipety. Zkontrolujete, že při přepravě nedošlo k rozbití nebo vylití obsahu ampulí do krabice. Zkontrolujte, zda aluminiový sáček s mikrotitrační destičkou není protřzen nebo zničen.

3. Rozředte veškerý obsah koncentráту promývacího roztoku dle výše uvedeného návodu.

4. Rozředte Kalibrátor dle výše uvedeného návodu.

5. Nechejte všechny komponenty dosáhnout pokojové teploty (asi 1 hodinu) a pak je promíchejte dle výše uvedeného návodu.

6. Nastavte inkubátor ELISA na +37°C a napus'te promývačku ELISA zředěným promývacím roztokem podle pokynů výrobce. Nastavte správný počet promývacích cyklů podle výsledků testů přístroje pro použití s touto soupravou.

7. Zkontrolujte, zda ELISA reader byl zapnutý alespoň 20 minut před použitím.

8. Pokud používáte automatickou pracovní stanici, zapněte ji a ujistěte se, že používáte správný protokol testu.

9. Zkontrolujte, zda jsou mikropipety nastaveny na požadovaný objem.

10. Zkontrolujte, že je všechno ostatní zařízení připravené k použití.

11. V případě problémů nepokračujte v testu a konzultujte vedoucího pracovníka.

M. POSTUP ANALÝZY

Tato analýza musí být provedena v souladu s postupem uvedeným níže. Je nutno dodržet stejnou dobu inkubace pro všechny testované vzorky.

Analýza na automatu:

V případě, že se analýzu provádí ELISA automat, nastavte zařízení na nasátí 200 µl ředícího roztoku vzorků a dále 10 µl vzorku. Pak tuto směs nechte nadávkovat přímo do příslušné jamky mikrotitrační destičky. Před nasátím dalšího vzorku, musí být jehla řádně promyta, aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků.

Kontrolní vzorky a kalibrátor již neředte, protože jsou připraveny k okamžitému použití.

Do příslušných jamek dávkujte 200 µl kontrolních vzorků nebo kalibrátoru.

Důležité upozornění: Zrakem kontrolujte, zda jsou vzorky zředěny a zda jsou dávkovány do příslušných jamek. Poznáte to podle toho, že barva zředěných vzorků se změní na tmavě modrozelenou a barva negativního kontrolního vzorku zůstane olivově zelená.

U dalších operací se řiďte pokyny pro ruční provádění analýzy.

Důrazně doporučujeme kontrolovat, zda zařízení počítá časovou prodlevu mezi dávkováním prvního a posledního vzorku, a zda ji vezme v úvahu při prodlevě před prvním promýváním.

Ruční analýza:

1. Do rámečku vložte požadovaný počet stripů nebo jamek. Ponechte první jamku prázdnou pro blank.

2. Dávkujte 200 µl Negativního kontrolního vzorku do tří jamek, 200 µl Kalibrátoru do dvou jamek a 200 µl Pozitivního kontrolního vzorku do jediné jamky. Kontrolní vzorky a Kalibrátor neředte, jsou předředěny a připraveny k okamžitému použití.

3. Do všech jamek dávkujte 200 µl ředícího roztoku vzorků (DILSPE). Pak dávkujte 10 µl vzorku do každé řádně identifikované jamky. Jemně se stripy v rámečku zatřepete, aby se roztok dobře promíchal. Zabraňte vylití roztoku z jamek a tím případné vzájemné kontaminaci.

Důležité upozornění: Zkontrolujte, zda se barva ředícího roztoku vzorků po přidání ke vzorku změní ze světle zelené na tmavě modrozelenou. Poznáte podle toho, zda vzorek již byl přidán.

4. Dávkujte 50 µl ředícího roztoku (DILAS) do všech jamek s kontrolními vzorky a se vzorky pacienta. Zkontrolujte, zda se barva vzorků změnila na tmavě modrou.

5. Inkubujte mikrotitrační destičku po dobu 45 minut při +37°C.

Důležité upozornění: Stripy musí být přikryty adhezivní fólií pouze pokud se test provádí ručně. Nezakrývejte stripy používáte-li ELISA automat.

6. Promyjte mikrotitrační destičku v automatické promývačce s dávkováním a odsátím 300 µl zředěného promývacího roztoku na jednu jamku, jak je uvedeno výše (část 1.3).

7. Pipetou dávkujte 100 µl Enzymatického konjugátu do každé jamky, vyjma první jamky (A1) sloužící jako blank, a přikryjte destičku fólií. Zkontrolujte, zda je tato červeně zbarvená komponenta přidána do všech jamek, mimo jamky A1.

Důležité upozornění: Nedotýkejte se vnitřního povrchu jamek špičkou s enzymatickým konjugátem, mohlo by dojít ke kontaminaci.

8. Inkubujte destičku 45 minut při +37°C.

9. Promyjte destičku jak je popsáno v kroku 6.

10. Dávkujte pipetou 100 µl směsi Chromogenu a substrátu do každé jamky, včetně jamky A1 (blank). Pak destičku 15 minut inkubujte při pokojové teplotě (+18 až +24°C).

Důležité upozornění: Nevystavujte silnému osvětlení. Výsledky testu by mohly být zkresleny.

11. Dávkujte 100 µl kyseliny sírové, kterou zastavíte enzymatickou reakci, do všech jamek ve stejném pořadí v jakém jste prováděli dávkování v kroku 10. Přidání kyseliny změní barvu pozitivních vzorků pacienta a pozitivního kontrolního vzorku z modré na žlutou.

12. Změňte intenzitu barvy roztoku v každé jamce tak, jak je popsáno v části 1.5 s použitím filtru 450 nm (čtení) a případně s filtrem 620-630 nm (kontrola). Přístroj vynulujte na jamce A1.

Důležitá upozornění:

1. Pokud nemáte druhý filtr, přesvědčete se před měřením readerem s filtrem 450 nm, že na spodní straně stripu nejsou žádné otisky prstů. Otisky by mohly zavinit falešné pozitivní výsledky.

2. Měření musí být provedeno ihned nebo do 20 po přidání Stop roztoku. Při prodlevě by mohlo dojít k oxidaci chromogenu.

N. SCHÉMA ANALÝZY

Metoda	Operace
Kontrolní vzorky a kalibrátor	200 µl
Vzorky pacienta	200 µl dil.+10 µl
Ředící roztok (DILAS)	50 µl
1. inkubace	45 min
Teplota	+37°C
Promývání	4-5 cyklů
Enzymatický konjugát	100 µl
2. inkubace	45 min
Teplota	+37°C
Promývání	4-5 cyklů
TMB/H ₂ O ₂	100 µl
3. inkubace	15 min
Teplota	Pokojová
Kyselina sírová	100 µl
Měření OD	450 nm

Příklad dávkování:

	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										
G	CAL	S7										
G	PC	S8										
H	S1	S9										

Legenda:

BLK = Blank
 NC = Negativní kontrolní vzorek
 CAL = Kalibrátor
 PC = Pozitivní kontrolní vzorek
 S = Vzorek pacienta

O. INTERNÍ KONTROLA JAKOSTI

Kontrolní vzorky a kalibrátor se kontrolují při každém použití soupravy, aby se ověřilo, zda jejich hodnoty měřené s filtrem 450 nm odpovídají očekávaným hodnotám uvedeným níže.

Pokud výsledky testu splňují výše uvedené požadavky, pokračujte v práci dle dalšího textu:

Kontrola	Hodnoty
Blank	< 0,100 OD450nm
Negativní kontr. vz. (NC)	< 0,050 prům. OD450nm po vynulování
Kalibrátor	S/Co > 1
Pozitivní kontr. vz.	> 1,000 OD450nm

Pokud nesplňují požadavky, nepokračujte v testu a postupujte následovně:

Problém	Zkontrolujte zda
Blank > 0,100 OD 450nm	1. Chromogen / substrát nebyl během rozboru kontaminován.
Negativní kontrolní vzorek (NC) > 0,050 OD 450 nm po vynulování	1. promývání a nastavení promývačky odpovídá předpisům 2. byl použit správný promývací roztok a zda byla promývačka pře použitím řádně naplněna; 3. během postupu nedošlo k chybě (dávkování pozitivního kontrolního vzorku místo negativního k. vz.) 4. nedošlo ke kontaminaci negativního kontrolního vzorku nebo jamky pozitivními vzorky nebo enzymatickým konjugátem přelitím 5. pipety nebyly kontaminovány pozitivními kontrolními vzorky nebo enzymatickým konjugátem 6. jehly promývačky nejsou úplně nebo částečně ucpané
Kalibrátor S/Co < 1	1. postup byl proveden správně 2. při dávkování nedošlo k chybě (např.: záměna za negativní kontr. Vzorek) 3. promývání a nastavení promývačky odpovídá předpisům 4. nedošlo k vnější kontaminaci kalibrátoru

Pozitivní kontrolní vzorek < 1,000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none"> postup byl proveden správně při dávkování nedošlo k chybě (např.: záměna pozitivního vzorku za negativní kontr. Vzorek). V takovém případě bude mít negativní kontr. Vzorek hodnotu OD450nm > 0,150. promývání a nastavení promývačky odpovídá předpisům nedošlo k vnější kontaminaci pozitivního kontr. vzorku
--	---

Pokud by nastaly uvedené problémy, obraťte se po provedení kontroly na vedoucího pracovníka, aby určil další postup.

P. VÝPOČET KOEFICIENTU

Výsledky testu se počítají pomocí průměrné hodnoty koeficientu určeného podle následujícího vzorce:
 $Koeficient = NC \text{ průměr při OD450nm} + 0,350$
 Vypočítaná hodnota pro test se použije pro interpretaci výsledků podle popisu v následujícím odstavci:

Důležité upozornění: Pokud se kalkulace provádí pomocí automatické pracovní stanice ELISA, ujistěte se, že pro výpočet koeficientu je použit správný vzorec a vygenerujete správnou interpretaci.

Q. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky testu se interpretují jako poměr vzorku měřeného při 450 nm a hodnoty koeficientu (neboli S/Co) podle následující tabulky:

S/Co	Interpretace
< 0,9	Negativní
0,9 – 1,1	Dvojnázný
> 1,1	Pozitivní

Negativní výsledek indikuje, že pacient nebyl infikován HEV, nebo že odebraná krev může být použita pro transfúzi.

Každý pacient vykazující dvojnázný výsledek by měl být znovu otestován, vzorek jeho krve má být odebrán o 1 až 2 týdny později. Odebraná krev se nesmí použít pro transfúzi.

Pozitivní výsledek indikuje infekci HEV a s pacientem by se mělo podle toho zacházet, odebranou krev je nutno zlikvidovat

Důležité poznámky

- Interpretace výsledků by měly být provedena pod dohledem vedoucího pracovníka zodpovídajícího za laboratoř, aby se snížilo riziko chybných závěrů nebo interpretací
- Všechny pozitivní výsledky by měly být potvrzeny alternativní metodou schopnou detekovat protilátky IgG a IgM (konfirmační test) dříve, než bude vyslovena diagnóza vorové hepatitidy
- Pokud je rozbor schopný detekovat také protilátky IgM mohou se u jiných komerčních výrobků pro detekci protilátek proti HEV objevit odlišné výsledky. Skutečná pozitivita vzorku na přítomnost protilátek proti HEV by pak měla být potvrzena testováním reaktivity IgM, která je pro diagnózu infekce HEV důležitá.
- Při přenosu dat z laboratoře do informačního centra je třeba zabránit chybnému přenosu dat.
- Diagnóza infekce virovou hepatitidou musí být pacientovy sdělena pouze kvalifikovaným lékařem.

Příklad výpočtu:

Následující data se nesmí používat místo skutečně naměřených hodnot.

Negativní kontrolní vzorek: 0,019 – 0,020 – 0,021
OD 450 nm

Průměrná hodnota: 0,020 OD 450nm

Menší než 0,050 – Schváleno

Pozitivní kontrolní vzorek: 2,189 OD 450nm

Vyšší než 1,000 – Schváleno

Koeficient = $0,020 + 0,350 = 0,370$

Kalibrátor: 0,550 – 0,530 OD 450nm

Průměrná hodnota: 0,540 OD 450nm S/Co = 1,4

S/Co vyšší než 1,0 – Schváleno

Vzorek 1: 0.070 OD450nm

Vzorek 2: 1.690 OD450nm

Vzorek 1 S/Co < 0.9 = negativní

Vzorek 2 S/Co > 1.1 = pozitivní

R. ÚČINNOST

Vyhodnocení účinnosti bylo provedeno na negativních a pozitivních vzorcích v externím klinickém středisku s referenční soupravou schválenou FDA.

1. LIMITY DETEKCE

Limity detekce analýzy byly vypočítány pomocí referenční reagentie pro protilátky proti HEV, 1. WHO NIBSC kód 95/584. Tento preparát byl detekován s koeficientem při pětinašobném rozředění v negativním kontrolním vzorku

2. DIAGNOSTICKÁ PŘESNOST A CITLIVOST

Tento parametr byl kontrolován na více než 700 vzorcích.

2.1 Diagnostická specifita:

Diagnostická specifita je definována jako pravděpodobnost, že analýza vykáže negativní výsledky při absenci specifického analytu. Bylo testováno celkem více než 500 nevybíraných dárců a HEV negativních hospitalizovaných pacientů včetně dárců, kteří darovali krev poprvé.

Diagnostická přesnost byla posuzována v porovnání se soupravou schválenou FDA USA. Byla zjištěna přesnost vyšší než 99%. Navíc byla diagnostická přesnost posuzována testováním více než 50 potenciálně rušivých vzorků (jiné infekční choroby, pozitivní na přítomnost protilátek proti E.coli, pacienti postižení neviróvými jaterními chorobami, pacienti na dialýze, těhotné ženy, hemolizované vzorky, lipemické vzorky atd.)
Byla zjištěna 100% přesnost.

Nebyla zjištěna žádná falešná reaktivita způsobená přípravou vzorků. Pro určení přesnosti byla použita jak plasma, získaná různými standardními metodami přípravy (citrát, EDTA a heparin), tak sérum.

Kvůli kontrole interference metodou odběru a skladování byly také testovány zmrazené vzorky.

Nebyla pozorována žádná interference.

2.2 Diagnostická citlivost

Diagnostická citlivost je definována jako pravděpodobnost, že analýza vykáže pozitivní výsledky za přítomnosti specifického analytu.

Citlivost byla posuzována externě i interně na celkovém počtu 200 pozitivních vzorků. Byla zjištěna 100% citlivost.

3. PŘESNOST:

Přesnost byla vypočítána na dvou vzorcích, jednom negativním a jednom málo pozitivním. Byla přezkoušena na 16 replikátech ve třech oddělených testech. Hodnoty CV se pohybovaly mezi 5 – 10 %, v závislosti na hodnotách OD450nm. Shledaná variabilita se neodrazila na chybné klasifikaci vzorků.

S. LIMITY

Opakované falešné pozitivní výsledky byly zjištěny u méně než 1 % normální populace.

Bylo zjištěno, že zmrazené vzorky obsahující po rozmrazení částice fibrinu nebo shluky někdy vykazují falešné výsledky.

REFERENCE

- Ellner PD, Neu HC. Viral agents of gastroenteritis. In "Understanding infectious disease. St.Louis: Mosby-Year Book, 1992, pp183-186.

Doc.:	INS EVAB.CE	Strana	6 ze 6	Verze.:	08/02MS
-------	-------------	--------	--------	---------	---------

2. Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis virus. In "Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al. (eds), Manual of clinical laboratory immunology, 4th ed. Washington, DC: ASM, 1992, pp634-650.
3. Fody EP, Johnson DF. J Med Technol 1987, 4:54-59.
4. Bradley D.W. et al.. Br.Med.Bull. 46: 442-461, 1990
5. Dawson G.J. et al.. J.Virol.Methods 38: 175-186, 1992
6. Favorov M.O. et al.. J.Med.Virol.. 36: 246-250, 1992
7. Purdy M. et al.. J.Arch.Virol. 123: 335-349, 1992
8. Tam A.W. et al.. Virology 185: 120-131, 1991

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod kontrolou systému pro řízení jakosti a ochrany životního prostředí, který splňuje požadavky ISO 13485 jak jsou deklarovány autorizovaným orgánem EC č. 0318 v certifikátu č. 2003 12 0388
--

Vyrábí: Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl. via Columella n° 31 – Milano – Italy			
Doc.:	INS EVAB.CE	Verze:	01/2004
Schválil ved. odd. Jakosti:	M. Marchisio		

Dodavatel:

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

