

## ELISA souprava - HEV IgG

### A. POUŽITÍ

Třetí generace ELISA testu pro kvalitativní detekci IgG protilátek proti viru hepatitidy E v lidské krevní plazmě nebo séru. Souprava může být použita pro screening krevních konzerv a ke sledování HEV infikovaných pacientů. Pouze pro použití „*in vitro*“.

### B. ÚVOD

Virus hepatitidy typu E (HEV) je popsán jako původce hepatitidy E, která je přenosná orofekální cestou. Jedná se o neobalený virus s jednovláknitou RNA strukturálně podobný Calicivirům, který je nacházen ve stolici infikovaných pacientů. HEV je vážným problémem hlavně v rozvojových zemích a poprvé byla popsána v roce 1955 v New Delphi v Indii. Hepatitida E neměla nikdy spojitost s chronickou infekcí; k vysokému procentu smrtelných případů dochází zejména u těhotných žen. Klonování a sekvenování genomu viru HEV vedlo k vývoji serologických testů určených k detekci protilátek proti HEV.

Tyto testy jsou založeny na syntetických imunodominantních antigenech odvozených od neměnných regionů viru.

### C. PRINCIP TESTU

Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy specifickým syntetickým antigenem HEV získaným z imunodominantních částí mexického a burma typu viru. Do jamek je nejprve přidán ředěný vzorek. IgG protilátky proti HEV, jsou-li obsaženy ve vzorku, se specificky váží na antigen fixovaný na destičce. Po vymytí, nenavázaných komponent, se během druhé inkubace detekují navázané IgG protilátky proti HEV pomocí specifické protilátky proti lidským IgG, které jsou značeny křenovou peroxidázou. Navázaný enzym pak reaguje se směsí chromogenu/substrátu za vzniku zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství IgG protilátek proti HEV obsažených ve vzorku. Pomocí hladiny cut-off jsou vzorky rozděleny na pozitivní nebo negativní.

### D. OBSAH SOUPRAVY

Souprava obsahuje reagentie v množství dostačující pro provedení 96 testů.

#### 1. Mikrotitrační destička:

12 stripů s 8 jamkami pokrytými HEV syntetickým antigenem 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 4°C.

#### 2. Negativní kontrolní vzorek:

1x2ml. Připraveno k přímému použití. Složení: 1% kozích sérových proteinů; 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.5% Tween 20; 0.09 % azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans. Negativní kontrola je kódována olivově-zelenou barvou.

#### 3. Pozitivní kontrolní vzorek:

1x2.0ml. Připraveno k přímému použití. Složení: lidské IgG protilátky proti HEV, 1% kozích sérových proteinů; 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.5% Tween 20; 0.09 % azid sodný a 0.1% Kathon GC jako konzervans. Pozitivní kontrola je kódována tmavě zelenou barvou.

#### 4. Kalibrátor

1 lahvička. Lyofilizát je potřeba před použitím rozpustit v redestilované vodě dle údajů na nálepce lahvičky. Složení: proteiny fetálního bovinního séra, lidské IgG protilátky proti HEV, jejich koncentrace je kalibrována podle NIBSC kódu 95/584 na hodnotu 4 +/-10% IU ml, 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.3 mg/ml gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC jako konzervans. **Poznámka:** objem pro naředění lyofilizátu je proměnný s různou výrobní šarží. Používejte vždy objem uvedený na nálepce lahvičky.

#### 5. Koncentrát promývacího pufru:

1x60ml. 20ti násobný koncentrát, který se před použitím ředí destilovanou vodou. Složení: 10mM PBS o pH 7.0+/-0.2; 0.05% Tween 20 a 0.1% Kathon GC.

#### 6. Enzymatický konjugát

1x16ml. Připraveno k přímému použití. Složení: polyklonální protilátky proti lidskému IgG konjugované s křenovou peroxidázou; 5% BSA, 10 mM Tris pufr o pH 6.8+/-0.1; 0.02% gentamycin sulfátu a 0.1% Kathon GC. Konjugát je kódován červeně.

#### 7. Chromogen/Substrát:

1x16ml. Připraven k přímému použití. Lahvička 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.

#### 8. Assay pufr

1x8ml Připraveno k přímému použití. Složení: 10mM TRIS pufr, pH 8.0+/-0.1; 0.1% Kathon GC. Určen k ošetření kontrol, vzorků v jamkách mikrodestičky, blokuje interference.

#### 9. Stop roztok:

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

#### 10. Ředící roztok vzorků:

1x 50 ml. Složení: 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.5% Tween 20; 0.09% azid sodný a 0.1% Kathon GC.

#### 11. Krycí fólie na mikrotitrační destičku.

2 ks

#### 12. Návod k použití

### E. MATERIÁL NEDODÁVANÝ V SOUPRAVĚ

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

## F. BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ

1. Se soupravou smí pracovat pouze vyškolený personál pod dohledem doktora medicíny, zodpovědného za chod laboratoře (supervizor).
2. Pokud je souprava používána ke kontrole krevních konzerv a krevních derivátů, musí být laboratoř pro tuto činnost certifikována národní autoritou (MZd, NRL..)
3. Personál provádějící vyšetření musí být oblečen v ochranném laboratorním oděvu, jsou vyžadovány gumové rukavice a ochranné brýle. Vyvarujte se použití ostrých předmětů (jehel, žilettek). Personál musí být proškolen, jako to doporučuje Centrum pro kontrolu chorob (Centre for Disease Control) / Národní institut zdravotí (U.S. Institutes of Health publication) "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984
4. Personál pracující se vzorkem má být vakcinován proti HAV a HBV, a to vakcínami, které jsou bezpečné a efektivní.
5. Kontrolované laboratorní prostředí má zabránit kontaminaci otevřených lahvíček a mikrotitrační destičky, během používání soupravy, mikroorganismy z prachu nebo vzduchu. Roztok substrátu nevystavujte působení intenzivního světla.
6. Soupravu skladujte při 2-8 °C v chladničce s kontrolovanou teplotou nebo v chladicím boxu.
7. Nikdy nemíchejte reagentie z různých výrobních šarží. Nedoporučujeme používat ani reagentie ze stejné šarže pocházející z různých souprav.
8. Zkontrolujte, zda jsou všechny reagentie čiré a zda neobsahují viditelné částice nebo shluky. Pokud tomu tak není, použijte k vyšetření novou soupravu.
9. Zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každého vzorku.
10. Zabraňte křížové kontaminaci mezi reagentiemi, používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každé reagentie.
11. Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace celé soupravy i jednotlivých lahvíček.
12. 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.
13. Doporučujeme používat jednorázové plastové nádoby pro přípravu reagentií nebo jejich pro přenos do ELISA automatu, tak aby se zabránilo jejich křížové kontaminaci.
14. 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, musí být ošetřen jako potenciálně infekční materiál a před vypuštěním 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.

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

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

17. 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 A DOPORUČENÍ

1. Souprava je určena k vyšetřování vzorků lidského krevního séra nebo plasmy, získaných standardními technikami přípravy pro klinické analýzy. Nebyly pozorovány žádné vlivy při použití citrátu, EDTA a heparinu při separaci plasmy.
2. Vyhněte se přidávání konzervačních látek do vzorků (zejména azidu sodného), které by mohly potlačit enzymatickou reakci konjugátu, což vede k falešně negativním výsledkům.
3. Vzorky musí být jednoznačně označeny kódem nebo jménem, aby nedošlo k jejich záměně. Pokud je souprava používána pro screening krevních konzerv doporučujeme značení čárovým kódem a elektronické čtení kódů.
4. Nepoužívejte hemolyzované a hyperlipemické vzorky, stejně jako vzorky obsahující rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic, protože mohou vést k falešným výsledkům.
5. Vzorky mohou být skladovány při teplotě 2–8°C až pět dnů od odběru. Pro delšího skladování je nutno je mrazit při teplotě – 20°C. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte, neboť takto ošetřené vzorky mohou poskytovat falešné výsledky.
6. Pokud jsou přítomny částice, odstředte vzorek při 2000 RPM po dobu 20 minut nebo jej filtrujte použitím filtru 0.2-0.8 μ až do vyčistění vzorku.

## H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A UPOZORNĚNÍ

Studie zaměřená na trvanlivost otevřené soupravy neprokázala žádné relevantní ztráty aktivity u reagentií 6x opakovaně použitých po dobu šesti měsíců.

### 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:

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

### 4. Kalibrátor:

Pečlivě rozpustě lyofilizát lahvičky deionizovanou vodou v objemu uvedeném na nálepce. Před použitím dobře protřepejte. S touto komponentou zacházejte jako s potenciálně infekční, i když byl HEV potencionálně přítomný v kontrole chemicky inaktivovaný.

*Poznámka: Rozpuštěný kalibrátor není stabilní, skladujte ho v zamražených alikvotech.*

### 5. Promývací roztok:

Koncentrát musí být před použitím zředěn 20x redestilovanou vodou. Celý obsah 20x koncentrovaného roztoku můžete ředit s 1200 ml redestilované vody. Jemně promícháme překlápěním. Jednou naředený 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.

*Poznámka: Jednou naředený promývací roztok je stabilní 1 týden při 2 až 8°C.*

### 6. Konjugát:

Přípraven k přímému použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu. Buďte opatrní, nekontaminujte tekutinu oxidačními činidly, vzdušným prachem nebo mikroorganismy. Konjugát může být přenášen pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

### 7. Substrát:

Přípraven 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.

### 8. Assay diluent

Přípraveno k použití. Před použitím pečlivě protřepejte.

### 9. Stop roztok:

Přípraven 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.

### 10. Ředící roztok vzorků

Přípraveno k použití. Před použitím pečlivě protřepejte.

## I. PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

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

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

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

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

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

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

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

## L. PŘÍPRAVA NA ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

1. Zkontrolujte datum expirace soupravy uvedené na obalu. Nepoužívejte exspirované soupravy.

2. Zkontrolujte, zda nejsou tekuté komponenty soupravy kontaminovány viditelnými částicemi nebo sraženinami. Zkontrolujte, zda roztok Substrátu je bezbarvý nebo světle modrý nasátím malého množství sterilní plastovou pipetou. Zkontrolujte, zda při převozu soupravy 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 lyofilizovaný kalibrátor, jak je popsáno výše.

5. Ponechte všechny ostatní komponenty soupravy vytemperovat na pokojovou teplotu (asi jednu hodinu) a pak jemně promixujte na vortexu všechny tekuté reagentie.

6. 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.

7. Zkontrolujte, zda je zapnutý ELISA reader musí být zapnut minimálně 20 min před měřením.

8. Pokud používáte automat, zapněte jej, 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.

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

### M. VLASTNÍ ANALÝZA

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

#### Analýza na automatu:

V případě, že test provádíte na ELISA automatu doporučujeme nejdříve nasát 200 µl diluentu a pak 10 µl vzorku. Tato směs může být pipetována přímo do jamek mikrotitrační destičky. Pipetovací jehla musí být mezi vzorky dobře omyta, tak aby se předešlo křížové kontaminaci.

Kontroly a kalibrátor neřeďte, jsou připraveny přímo k použití. Pipetujte 200 µl kontrol a kalibrátou do příslušných jamek.

**Poznámka:** vizuálně zkontrolujte, že vzorky byly předředěny a pipetovány do správných jamek, porovnáním zabarvení roztoků v jamkách, vzorky jsou tmavě zelené, kontroly olivově zelené.

Další kroky jsou stejné jako u manuálně prováděné analýzy.

Doporučujeme přesně kontrolovat čas mezi napipetováním prvního a posledního vzorku a nastavit čas dispenzace dalších reagentů ve stejném intervalu.

#### Manuální analýza:

1. Umístěte požadovaný počet stripů do rámečku. Jamku A1 ponechte prázdnou pro (BLANK).

2. Pipetujte 200 µl negativní kontroly (v triplicátu), 200 µl kalibrátoru (v duplikátu) a 200 µl pozitivní kontroly (v monoplíkátu) do určených jamek. Kontroly a kalibrátor neřeďte, jsou připraveny přímo k použití.

3. Pipetujte 200 µl ředícího roztoku do jamek určených pro vzorky a přidejte 10 µl neředěného vzorku. Protřeptejte opatrně celou destičku tak aby nedošlo k přelívání roztoků z jamky do jamky.

**Poznámka:** zkontrolujte zabarvení jamek, tak aby jste se přesvědčili, že roztoky a vzorky byly správně dispenzovány.

4. Pipetujte 50 µl assay pufru do všech jamek včetně kontrol a kalibrátoru. Zkontrolujte tmavě modré zabarvení všech jamek.

5. Inkubujte destičku 45 minut při +37°C

**Poznámka:** stripy při inkubaci zakryjte přiloženou folií. Pokud pracujete na analyzátoru, stripy nezakrývejte.

6. Promyjte stripy na automatické promývačce 4x300µl promývacího roztoku jak bylo popsáno výše.

7. Přidejte 100µl konjugátu do každé jamky s výjimkou A1 a přikryjte je fólií. Zkontrolujte, zda jsou všechny jamky zbarveny červeně, kromě jamky A1.

**Poznámka:** buďte opatrní, nedotýkejte se pipetovací špičkou stěn jamek, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků.

8. Inkubujte destičku 45 minut při +37°C

9. Promyjte destičku stejně jako v bodě 6.

10. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky, včetně jamky A1. Inkubujte mikrotitrační destičku **při pokojové teplotě (18-24°C) po dobu 15 minut.**

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

11. Pipetujte 100 µl Stop roztoku do každé jamky ve stejném sledu jako v bodě 10. Přidání kyseliny změni barvu pozitivní kontroly a pozitivních vzorků z modré do žluta.

12. Změřte intenzitu zabarvení roztoků jamek ELISA readerem (kap. I.5.) 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 mikrotitrační destičky nenacházejí žádné šmouhy. Při měření při 450 nm mohou otisky prstů nebo šmouhy způsobit falešně pozitivní výsledky.

2. Měření musí být provedeno co nejdříve po přidání Stop činidla, nejpozději do 20 min. Autooxidace chromogenu, která se může objevit způsobí silné pozadí.

### N. SCHÉMA POSTUPU

Krok	Hodnota
assay diluent	50 µl
NC, PC, CAL	200 µl
ředící roztok + vzorek	200 +10µl
<b>1. inkubace</b>	<b>45 min</b>
Teplota	+37°C
Promytí	4-5 cyklů
Konjugát	100 µl
<b>2. inkubace</b>	<b>45 min</b>
Teplota	+37°C
Promytí	4-5 cyklů
substrát TMB	100 µl
<b>3. inkubace</b>	<b>15 min</b>
Teplota	pokojeová
Stop roztok	100 µl
měření (filtr)	450 nm

#### Pipetovací schéma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	S2										
B	NC	S3										
C	NC	S4										
D	NC	S5										
E	CA	S6										
F	CA	S..										
G	PC	S..										
H	S1	S..										

Legenda: B - Blank, NC - Negativní kontrola  
PC - Pozitivní kontrola, CA - kalibrátor, S – vzorek

### O. VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

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

Parametr	požadovaná hodnota
BLANK	< 0.100 OD 450 nm
negativní kontrola (NC)	< 0.050 OD 450 nm (po blanku)
kalibrátor	S/Co > 1
pozitivní kontrola (PC)	> 0.100 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> OD > 0.100	1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu
<b>Negativní kontrola</b> OD > 0.050 Po odečtu blanku	1. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 2. zda byl použit správný promývací roztok a zda jim byla promývačka naplněna před použitím 3. zda nebyla udělána chyba při pipetování kontrol (pozitivní kontroly místo negativní) 4. zda nedošlo ke kontaminaci NC nebo jamek do nichž byla NC napipetována pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu 5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem 6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpány
<b>Kalibrátor</b> S/Co < 1.000	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování kalibrátoru (př. záměna negativní kontroly místo kalibrátoru) 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci kalibrátoru
<b>Pozitivní kontrola</b> OD < 1.000	5. zda byl dodržen pracovní postup 6. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. záměna negativní kontroly místo pozitivní) 7. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 8. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly

V případě, že se objevil některý z uvedených problémů, oznamte jej supervizorovi a požádejte o další postup.

### P. VÝPOČET CUT-OFF

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

$$\text{Cut-Off} = \text{průměr NC} + 0.350$$

Hodnoty stanovené v testu jsou interpretovány způsobem popsáním níže

**Poznámka:** v případě, že kalkulaci a interpretaci výsledků provádí automatický ELISA systém, se předem ujistěte, že vzorec pro výpočet Cut-off a parametry interpretace výsledků jsou nastaveny správně.

### Q. 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 HEV.

U pacienta s dubiózním výsledkem musí být znovu vyšetřen vzorek krve odebraný za 1-2 týdny.

Pozitivní výsledek svědčí o infekci virem HEV a pacient by měl být okamžitě léčen.

**Důležité poznámky:**

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

**Příklad výpočtu je uveden níže:**

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

Negativní kontrola OD: 0.019 – 0.020-0.021

Průměr OD450nm: 0.020

Validace: nižší než 0.050 – akceptováno

Pozitivní kontrola OD: 2.189

Validace: vyšší než 1.00 – akceptováno

$$\text{Cut-off} = 0.020 + 0.350 = 0.370$$

Kalibrátor: 0.550 – 0.530 OD450nm

Průměr OD450nm: 0.540

Validace: S/Co = 1.4

vyšší než 1.0 – akceptováno

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. PARAMETRY

Uvedené výsledky byly dosaženy na souborech negativních a pozitivních vzorků získaných z externího klinického centra a ověřených referenční soupravou doporučenou FDA.

### 1. LIMIT DETEKCE:

Limit detekce tohoto testu byl testován pomocí prvního referenčního standardu WHO pro HEV protilátku (NIBSC kód 95/584). Analýza ukazovala citlivost okolo 2 IU/ml.

### 2. DIAGNOSTICKÁ SPECIFICITA A SENSITIVITA:

Tyto parametry byly kontrolovány na souboru více než 700 vzorků.

#### 2.1. Diagnostická specifita:

Je definována jako pravděpodobnost, že vzorky s absencí analytu budou vyhodnoceny jako negativní. Bylo vyšetřeno více než 500 neselektovaných dárců a HEV negativních hospitalizovaných pacientů, včetně prvodárců krve. Diagnostická specifita byla stanovena vůči soupravě homologované FDA. Byla zjištěna specifita vyšší než 99.5%.

Specifita byla dále testována na více než 100 potenciálně interferenčních vzorků (jiné infekční onemocnění, vzorky pozitivní na protilátky proti E. Coli, pacienti s nevírovým jaterním onemocněním, dialyzovaní pacienti, těhotné ženy, hemolyzované, lipemické vzorky, aj.) Byla stanovena specifita 100%. Nebyla pozorována ani falešná reaktivita způsobená různou metodou přípravy vzorků plasmy různými standardizovanými postupy přípravy (citrát, EDTA, heparin) a séra.

Zmražené vzorky byly testovány, aby byly zjištěny případné interference způsobené odběrem a skladováním. Žádné interference nebyly pozorovány.

#### 2.2. Diagnostická sensitivita:

Je definována jako pravděpodobnost, že vzorky, ve kterých je zjišťovaný analyt přítomen, budou vyhodnoceny jako pozitivní vzorky. Sensitivita byla stanovována externě i interně na souboru 200 pozitivních vzorků; byla zjištěna diagnostická sensitivita 100%.

### 3. Přesnost:

Byla vypočítána pomocí dvou vzorků, jednoho pozitivního a jednoho negativního, vyšetřených v 16 replikátech ve třech samostatných analýzách. Byly zjištěny hodnoty CV v rozmezí 5-10%, při OD450nm, které nevedly ke změně klasifikace vzorku.

## S. OMEZENÍ

Opakovaně falešně pozitivní výsledky byly pozorovány u méně než 1% normální populace. Opakovaně rozmrazované vzorky obsahující fibrinové částice nebo shluky mohou po rozmrazení dávat falešné výsledky.

## LITERATURA

1. Ellner PD, Neu HC. Viral agents of gastroenteritis. In "Understanding infectious disease. St.Louis: Mosby-Year Book, 1992, pp183-186.
2. Hollinger FB, Dreesman GR. Hepatitis virus. In "Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, et al. (eds), Manual of clinical laboratory immunology, 4<sup>th</sup> 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

<p><b>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 jak je stanovenou NB no. 0318</b></p>
---

Vyrábí: Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl. via Columella n° 31 – Milano – Italy			
Doc.:	INS EVG.CE	Verze:	07/2004
schválil ved. odd. jakosti:		M. Marchisio	

## Kontakt na dodavatele:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

http: [www.laboserv.cz](http://www.laboserv.cz), e-mail: [laboserv@laboserv.cz](mailto:laboserv@laboserv.cz)