

HBsAb

ELISA test pro kvalitativní/kvantitativní stanovení protilátek proti povrchovému antigenu hepatitidy B v lidském séru a plazmě

pouze pro diagnózu "in vitro"



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes,
Srl Via Columella n° 31, 20128
Milano - Itálie**

Telefon +39 02 27007161

Fax +39 02 26007726

e-mail: diapro@tin.it

REF SAB.CE 96 testů

HBs Ab

A. PŘEDPOKLÁDANÉ POUŽITÍ

ELISA test pro kvalitativní/kvantitativní stanovení protilátek proti povrchovému antigenu hepatitidy B v lidském séru a plazmě. Pouze pro účely "in vitro" diagnózy.

B. ÚVOD

Světová zdravotnická organizace (WHO) definuje infekci hepatitidou typu B následovně:

"Hepatitida typu B je jedno z významných lidských onemocnění a představuje vážný celosvětový zdravotní problém. Hepatitida představuje zánět jater a její nejobvyklejší příčinou je nakažení jedním z 5 virů, označených jako hepatitida A, B, C, D a E. Všechny tyto viry mohou způsobit akutní onemocnění se symptomy trvajících několik týdnů, včetně zežloutnutí pokožky a očí (žloutenka), tmavé moči, extrémní únavy, nevolnosti, zvracení a bolesti břicha. Může trvat několik měsíců až rok, než se pacient opět cítí dobře. Virus hepatitidy typu B může způsobit chronickou infekci, během níž se pacient viru nikdy nezbaví a po řadě let se onemocnění vyvine v cirhózu jater nebo rakovinu jater.

HBV je nejvážnějším typem virové hepatitidy a jediným typem způsobujícím chronickou hepatitidu, proti němuž je k dispozici vakcína. Virus hepatitidy typu B virus se přenáší kontaktem s krví nebo tělními tekutinami nakažené osoby a to stejným způsobem, jako virus lidské imunodeficiency (HIV), tj. virus vyvolávající AIDS. HBV je však 50x až 100x nakažlivější než HIV. Hlavní způsoby nakažení HBV jsou: (a) perinatálně (dítě nakažené při narození matkou); (b) přenos mezi dětmi; (c) nebezpečné infekce a transfúze; (d) sexuální kontakt.

Ve světovém měřítku jsou převládajícími způsoby nakažení dítěte infikovanou matkou, kontakt mezi dětmi ve školkách a nakažení se při opakovaném použití nesterilizovaných jehel a injekčních stříkaček. V mnoha rozvojových zemích se virem nakazí téměř každé dítě. V řadě rozvinutých zemí (např. v západní Evropě a Severní Americe) je způsob přenosu odlišný. V těchto zemích zodpovídal před zavedením programů očkování dětí proti hepatitidě typu B za přibližně třetinu chronických infekcí přenos z matky na dítě a mezi dětmi. Většina infekcí v těchto zemích je však získávána během prvních let dospělosti následkem sexuální aktivity a injekční aplikace drog. Virus hepatitidy typu B navíc představuje významné profesionální zdravotní riziko pro pracovníky ve zdravotnictví, takže většina zaměstnanců zdravotnické sféry obdržela proti tomuto onemocnění vakcínu.

Virus hepatitidy typu B se nerozšiřuje kontaminovanými potravinami ani vodou a není rozšiřován náhodně na pracovišti. Vysoká míra chronického nakažení HBV se rovněž vyskytuje v jižních částech východní a střední Evropy. Na středním Východě a indickém subkontinentu je chronicky infikováno okolo 5 % populace. Infekce je méně obvyklá v západní Evropě a Severní Americe, kde je chronicky nemocných pouze 1 % lidí. Chronická infekce se s největší pravděpodobností vyvine u malých dětí. Okolo 90 % dětí nakažených v průběhu prvního roku života a 30 až 50 % dětí nakažených mezi 1. a 4. rokem života zaznamenává nákazu chronickou. U 25 % osob chronicky nakažených v průběhu dětství je zhruba 25 % riziko úmrtí vlivem k HVB se vztahující rakoviny jater.

Chronická hepatitida typu B se u některých pacientů léčí medikamenty nazývanými *interferon* nebo *lamivudin*, které mohou některým pacientům pomoci. Pacientům s cirhózou jsou někdy poskytovány jaterní transplantáty a to s různým úspěchem. Lepší, než tuto nemoc zažít a léčit ji, je předejít jí očkováním.

Vakcína na hepatitidu typu B se vyznačuje mimořádnou bezpečností a účinností. Od roku 1982 byla ve světě použita více než jedna miliarda dávek vakcín proti hepatitidě typu B. Tato vakcína se podává jako tři intramuskulární dávky. Studie ukázaly, že u 95 % dětí i

dospělých zabránila vakcína rozvoji chronické infekce, pokud tyto osoby ještě nebyly nakaženy. V mnoha zemích, kde bývalo chronicky infikováno HBV 8 % až 15 % dětí, byl podíl chronické infekce u imunizovaných skupin dětí snížen na méně než 1 %. Od roku 1991 WHO vyzývá všechny země, aby připojily vakcínu proti hepatitidě typu B do svých národních imunizačních programů.

Povrchový antigen hepatitidy typu B (HBsAg) je důležitý strukturální polypeptid obalu viru hepatitidy typu B (HBV). Tento antigen se skládá hlavně z typového běžného determinantu "a" a typově specifických determinantů "d" a "y", přítomných pouze u specifických sérotypů viru.

Po nakažení se nejprve rozvine silná imunitní odpověď proti typově specifickým determinantům a pak proti determinantu "a".

Nejúčinnějšími v neutralizování viru jsou však shledávány anti-"a" protilátky, chránící pacienta před dalšími infekcemi a umožňující mu rekonvalescenci.

Detekce HBsAb se stala důležitou při sledování pacientů nakažených HBV a při sledování příjemců po vakcinaci syntetickým a přírodním HBsAg.

C. PRINCIP ZKOUŠKY

Mikrotitrační destička je potažena vysoce čistým HBsAg, který se v první inkubaci se vzorkem váže na protilátky anti-HBsAg v pevné fázi. Po promytí jsou zachycené protilátky detekovány HBsAg označeným peroxidázou (HRP), čímž dochází k navázání na další vazebné místo protilátek.

Tento enzym navázaný na pevnou fázi, reagující v systému substrátu a chromogenu, generuje optický signál, jehož intenzita je přímo úměrná množství HBsAb ve vzorku a lze jej detekovat pomocí ELISA readeru. Množství protilátek lze kvantifikovat prostřednictvím standardní křivky kalibrované na referenční přípravek W.H.O.

Vzorky jsou v jamce před-ošetřeny ředícím roztokem vzorků, schopným blokovat interferenci vyskytující se u očkovaných jedinců.

OBSAH SOUPRAVY

Souprava obsahuje takové množství reagentů postačující pro provedení 96 testů.

1. Mikrodestička: MICROPLATE

12 stripů s 8 jamkami potažených vysoce čistým, teplem deaktivovaným HBsAg obou podtypů (ad i ay) lidského původu. Před otevřením sáčku nechejte mikrotitrační destičku dosáhnout pokojové teploty. Nepoužité stripy opět pevně uzavřete do sáčku a skladujte při teplotě 2-8 °C.

2. Kalibrační křivka: CAL N°...

5x2,0 ml. Připraveno k přímému použití, standardy označené barevně jsou odvozeny od HBsAb pozitivní plazmy s využitím standardu WHO na anti-HBsAg, rozsah: CAL1 = 0 mIU/ml // CAL2 = 10 mIU/ml // CAL3 = 50 mIU/ml // CAL4 = 100 mIU/ml // CAL 5 = 250 mIU/ml. Obsahuje proteiny lidského séra, 5 % BSA, 10 mM fosfátový pufr o pH 7,4+/-0,1, 0,09 % azid sodný a 0,1 % Kathon GC jako konzervans. Standardy jsou označeny modrou barvou.

3. Koncentrát mycího ústrojného roztoku: WASHBUF

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 0.05% Kathon GC.

4. Enzymatický konjugát : CONJ

1x16 ml. Připraveno k přímému použití. Obsahuje deaktivovaný, vyčištěný HBsAg obou podtypů ad i ay, označený HRP, 5 % BSA, 10 mM Tris pufr o pH 6,8+/-0,1, 0,3 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1 % Kathonu GC.

5. Chromogen/substrát: SUBS TMB

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

Poznámka: Skladujte v temnu.

6. Stop roztok: H₂SO₄ 0,3 M

1x15ml, lahvička obsahuje 0.3 M roztok kyseliny sírové H₂SO₄. Pozor: Zabraňte kontaktu s očima a pokožkou. Dráždivá látka - Xi R36/38, S2/26/30.

7. Roztok na ředění vzorků: DILSPE

1x8 ml. obsahuje 10 mM Tris pufr o pH 7,4 +/-0,1; 0,09 % azidu sodného jako ochrannou látku.

8. Kontrolní sérum: CONTROL ...ml 1 injekční lahvička. Lyofilizováno.

Obsahuje sérové proteiny z kravského plodu, lidské anti-HBsAg protilátky kalibrované při 50 ± 10 % WHO mIU/ml. Dále 0,3 mg/ml gentamycin sulfátu a 0,1 % Kathon GC.

9. Krycí fólie na mikrotitrační destičku – 2 x.**10. 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 vakcínami, které jsou dostupné, bezpečné a efektivní.
4. Laboratorní prostředí má být kontrolováno tak, aby se zabránilo kontaminaci otevřených lahviček a mikrotitrační destičky během používání soupravy mikroorganismy z prachu nebo vzduchu. Chromogen/Substrát nevystavujte působení světla.
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 lahviček.
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 kontejneru určeného pro infekční odpad.

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

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

PŘÍPRAVA VZORKŮ

1. Krev je odebírána asepticky, napíchnutím žíly a plazma nebo sérum se připraví s využitím standardních metod přípravy vzorků pro klinickou laboratorní analýzu. Nebyl pozorován vliv citrátu, EDTA ani heparinu.
2. 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.
3. Nepoužívejte hemolyzované a hyperlipemické vzorky, stejně jako vzorky obsahující rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic, protože mohou vést k falešným výsledkům.
4. 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 a to až po několik měsíců. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte, neboť takto ošetřené vzorky mohou poskytovat falešné výsledky.
5. Pokud jsou přítomny částice, odstředte vzorek při 2000 RPM po dobu 20 minut nebo jej filtrujte použitím filtru 0.2-0.8 µm až do vyčistění vzorku.
6. Vzorky, jejichž koncentrace anti-HBsAg protilátek je očekávána vyšší než 250 mIU/ml, by se měly před použitím rozpustit v poměru buďto 1:10 nebo 1:100 v kalibrátoru 0 mIU/ml. Rozpouštění je třeba provádět v čistých zkumavkách na jedno použití tak, že 50 ul každého vzorku rozpustíme se 450 ul kalibrátoru 0 (1:10). Pak se 50 ul roztoku 1:10 rozpustí se 450 ul kalibrátoru 0 (1:100). Při přípravě ředěných vzorků zkumavky důkladně pomíchejte pomocí vortexu.

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. Kalibrační křivka:

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

3. Kontrolní sérum:

Přidejte objem redestilované vody uvedené na etiketě k lyofilizovanému prášku. Nechejte zcela rozpustit a poté jemně zamíchejte na vortexu.

Poznámka: kontrola po rozpuštění není stabilní. Vhodné množství udržujte zmrazené při -20°C.

4. 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.

5. Enzymatický konjugát:

Připraveno k přímému použití. 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.

6. Roztok na ředění vzorků:

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

7. 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.

8. Stop roztok:

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

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

Legenda: R36/38 = dráždí oči a pokožku.

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

PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ POUŽÍVANÉ PŘI ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

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

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

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

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

5. ELISA reader musí být vybaven filtrem 450 nm, ideálně i filtrem 620 nebo 630 nm (BLANK). Musí splňovat následující technické parametry: linearita absorbance musí být vyšší nebo rovna 2 ABS, nastavení vlnových délek

menší nebo rovno 10 nm, měřicí rozsah nejméně 0.0 – 2.0 ABS, rozptýl měření pod 1%. Optický systém readeru musí být kalibrován a validován na správnost měření dané vlnové délky, reader musí být udržován dle požadavků výrobce a SLP.

6. Pokud používáte ELISA automat, musíte správně nastavit všechny kritické kroky (dispense, inkubace, promytí, čtení, zpracování dat). Stanice musí být udržována a validována odborným servisem dle požadavků výrobce a SLP. Doporučujeme nastavit protokol a validovat jej na souboru kontrol a vzorků se známou pozitivitou. Je potřeba také předcházet možnostem křížové kontaminace při opakované dispenzaci jehlou automatu. Používání ELISA automatu je doporučeno, pokud počet vzorků v jednom běhu je nejméně 20-30.

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

PŘÍPRAVA NA ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

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

2. Zkontrolujte, zda nejsou tekuté komponenty soupravy kontaminovány viditelnými částicemi nebo sraženinami. 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 tekutina. Zkontrolujte, zda hliníkový obal mikrotitrační destičky není porušený.

3. Naředte si potřebný objem koncentráту promývacího roztoku, jak je popsáno výše.

4. Rozpusťte kontrolní sérum, jak je popsáno výše a jemně promíchejte na vortexu.

5. Ponechte všechny ostatní komponenty soupravy vytemperovat na pokojovou teplotu (asi jednu hodinu) a pak jemně promixujte na vortexu všechny tekuté 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 anebo se ujistěte, že bude zapnut minimálně 20 min před měřením.

8. Pokud používáte automat, zapněte ho, zkontrolujte nastavení a ujistěte se, že používáte správný protokol.

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

10. Zkontrolujte, zda je všechno ostatní vybavení k dispozici a připraveno k použití.

Pokud se vyskytnou problémy, dále v testu nepokračujte a kontaktujte vedoucího.

VLASTNÍ ANALÝZA

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

Podle požadavků lékaře lze provádět kvantitativní i kvalitativní analýzu.

Kvantitativní analýza

1. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku. První jamku A1 a B1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK). Zbylé testy uchovávejte při teplotě 2 až 8°C s vysoušedlem.

Potom do všech jamek využívaných při testu s výjimkou A1 a B1 napipetujte 50 µl ředícího roztoku.

Důležitá poznámka: tento roztok se pipetuje před samotným pipetováním vzorků a kontrol do konkrétních jamek a jeho úkolem je hlavně blokování některých látek přítomných u lidí po očkování a schopných tyto protilátky neukázat.

2. Pipetujte 100 µl všech kalibrátorů, 100 µl kontrolního séra v duplikátu a 100 µl jednotlivých vzorků. Kontrolní sérum se používá k prověření, zda celý analytický systém správně funguje. Zkontrolujte, že byly správně přidány kalibrátory, kontrolní sérum a vzorky. Poté inkubujte mikrodestičku při **+37°C po dobu 60 min**.

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

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

4. Přidejte 100µl konjugátu do každé jamky s výjimkou A1 a B1. Zkontrolujte správné přidání činidla. Mikrodestičku inkubujte při **+37°C po dobu 60 minut**.

Důležitá poznámka:

- 1) Dbejte, abyste se při pipetování konjugátu nedotkli vnitřního povrchu jamky špičkou pipety. Mohlo by dojít ke kontaminaci.
- 2) Před použitím konjugát důkladně promíchejte na vortexu.

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

6. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky, včetně jamky A1 a B1. Inkubujte mikrotitrační destičku při pokojové teplotě (**18-24°C**) po dobu **20 minut**.

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

7. Enzymatickou reakci zastavte napipetováním 100 µl stop roztoku do každé jamky ve stejném sledu jako v předchozích bodech. Změňte intenzitu zabarvení roztoků jamek ELISA readerem při 450 nm pro odečet pozadí i při 620-630 nm. Jamku A1 a B1 použijte jako BLANK.

Kvalitativní analýza

1. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku. První jamku A1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK). Zbylé testy uchovávejte při teplotě 2 až 8°C s vysoušedlem.

2. Do všech jamek s výjimkou A1 napipetujte 50 µl ředícího roztoku. Poté pipetujte 100 µl kalibrátoru 0 mIU/ml v duplikátu, 100 µl kalibrátoru 10 mIU/ml v duplikátu, 100 µl kalibrátoru 250 mIU/ml a pak 100 µl vzorků. Zkontrolujte, zda byly kalibrátory a vzorky správně přidány. Poté mikrodestičku inkubujte při **+37°C po dobu 60 min**.

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

4. Do všech jamek s výjimkou A1 napipetujte 100 µl konjugátu. Zkontrolujte, zda bylo konjugát přidán správným způsobem. Mikrodestičku inkubujte při **+37°C po dobu 60 minut**.

Důležitá poznámka:

- 3) Dbejte, abyste se při dávkování konjugátu nedotkli vnitřního povrchu jamky špičkou pipety. Mohlo by dojít ke kontaminaci.
- 4) Před použitím konjugát důkladně protřepte na vortexu.

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

6. Přidejte 100 µl roztoku substrátu do každé jamky, včetně jamky A1. Inkubujte mikrotitrační destičku při pokojové teplotě (**18-24°C**) po dobu **20 minut**.

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

7. Enzymatickou reakci zastavte napipetováním 100 µl stop roztoku do každé jamky ve stejném sledu jako v předchozích bodech. Změňte intenzitu zabarvení roztoků jamek ELISA readerem při 450 nm pro odečet pozadí i při

620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

Důležité obecné 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.

SCHÉMA POSTUPU

Ředící roztok	50 ul
Kalibrátory	100 ul
Kontrolní sérum	100 ul
Vzorky	100 ul
První inkubace	60 min
Teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
Konjugát	100 ul
Druhá inkubace	60 min
Teplota	+37°C
promytí	4-5 cyklů
Směs TMB/H ₂ O ₂	100 ul
Třetí inkubace	20 min
Teplota	pokojeová teplota
Stop roztok	100 ul
Odečet OD	450nm & 620nm

Příklad umístění jamek na destičce při kvantitativním testu:

		Mikrodestička											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	CAL4	S3										
B	BLK	CAL4	S4										
C	CAL1	CAL5	S5										
D	CAL1	CAL5	S6										
E	CAL2	CS	S7										
F	CAL2	CS	S8										
G	CAL3	S1	S9										
H	CAL3	S2	S10										

Legenda: BLK = blank // CAL = kalibrátory // CS = kontrolní sérum // S = vzorek

Příklad umístění jamek na destičce při kvalitativním testu:

		Mikrodestička											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	S3	S11										
B	CAL1	S4	S12										
C	CAL1	S5	S13										
D	CAL2	S6	S14										
E	CAL2	S7	S15										
F	CAL5	S8	S16										
G	S1	S9	S17										
H	S2	S10	S18										

Legenda: BLK = blank // CAL = kalibrátory // S = vzorek

VNITŘNÍ KONTROLA KVALITY

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

Parametry	Požadavky
Blank	< 0,100 OD450 nm
Kalibrátor 0 WHO mIU/ml	< 0,200 OD450 nm po zatemnění
Kalibrátor 10 WHO mIU/ml	OD450 nm vyšší než OD450 nm kalibrátoru 0 mIU/ml + 0,100
Kalibrátor 250 WHO mIU/ml	> 1,500 OD450 nm
Kontrolní sérum	OD450 nm = OD450 nm CAL 50 mIU/ml ±10 %

Variační koeficient	< 30 % pro kalibrátor 0 mIU/ml
---------------------	--------------------------------

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

Problém	Zkontrolujte
Blank OD > 0.100	1. zda nedošlo ke kontaminaci r substrátu během testu
Kalibrátor 0 mIU/ml > 0,200 variační koeficient > 30 %	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 standardů 4. zda nedošlo ke kontaminaci kalibrátoru nebo jamek pozitivním vzorkem 5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem 6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpány
Kalibrátor 10 mIU/ml OD450 nm < Cal 0 + 0,100	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování kalibrátoru 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci standardu
Kalibrátor 250 mIU/ml < 1,500 OD450 nm	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování kalibrátoru 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci standardu
Kontrolní sérum lišící se od očekávané hodnoty	1. zda byl dodržen pracovní postup 2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. napipetování negativní kontroly místo pozitivní) 3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku 4. zda nedošlo k externí kontaminaci pozitivní kontroly. 5. zda bylo kontrolní sérum správně zředěno Pokud nebyly nalezeny žádné chyby, postupujte následovně: a) je zjištěna hodnota do +/-20 %; celková přesnost testu laboratoře by měla umožnit splnění očekávané hodnoty +/-10 %. Problém oznamte vedoucím nebo odmítněte uvedený výsledek. b) je obdržena hodnota vyšší než +/-20 %: v tomto případě je test neplatný a je třeba volat zákaznický servis DiaPro.

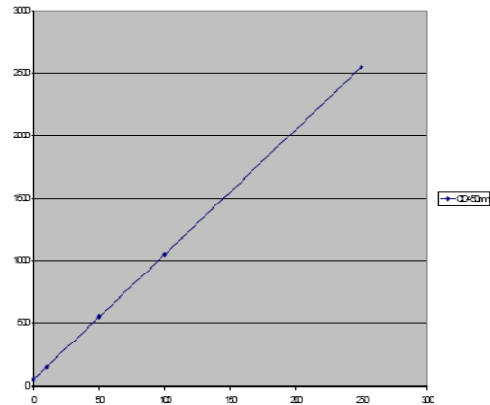
VÝSLEDKY

Kvantitativní metoda

Pokud je test shledán platným, využijte pro kvantitativní metodu program využívající naměřené hodnoty při 450 nm k vytvoření kalibrační křivky (doporučuje se čtyřparametrová interpolace).

Poté na kalibrační křivce spočítejte koncentraci anti-HBsAg protilátek ve vzorcích. Příklad kalibrační křivky je uveden na následující straně.

Příklad kalibrační křivky:



Důležitá poznámka:

Výše uvedenou kalibrační křivku nepoužívejte k provádění výpočtů.

Kvalitativní metoda

Při kvalitativní metodě vypočítejte průměrné hodnoty OD450nm pro kalibrátory 0 a 10 mIU/ml a pak zkontrolujte, zda je zkouška platná.

Příklad výpočtu:

Následující údaje nesmějí být použity namísto skutečných čísel získaných uživatelem.

Kalibrátor 0 mIU/ml: 0,020 – 0,024 OD450nm Průměrná hodnota: 0,022 OD450nm
Nižší než 0,200 – přijato

Kalibrátor 10 mIU/ml: 0,250 – 0,270 OD450nm Průměrná hodnota: 0,260 OD450nm
Výšší než Cal 0 + 0,100 – přijato

Kalibrátor 250 mIU/ml: 2,845 OD450nm Vyšší než 1,500 – přijato

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Vzorky s koncentrací nižší než 10 WHO mIU/ml jsou většinou mezinárodních lékařských zdrojů považovány za negativní na anti-HBsAg protilátky. Vzorky s koncentrací vyšší než 10 WHO mIU/ml jsou považovány za pozitivní na anti-HBsAg protilátky.

Při sledování příjemců vakcíny je však lékařskou literaturou jako minimální koncentrace, při níž se pacient považuje za klinicky chráněného před nákazou HBV, obvykle akceptována ještě i hodnota 20 WHO mIU/ml.

Důležité poznámky:

1. Interpretace výsledků by se měla provádět pod dohledem vedoucího laboratoře, aby bylo možno minimalizovat riziko chyb při posuzování a nesprávné interpretace.
2. Při přenosu výsledků z laboratoře do jiného zařízení je třeba dbát na to, abychom se vyhnuli přenášení chybných dat.
3. Diagnózu může konstatovat a pacientovi sdělovat pouze lékař s vhodnou kvalifikací.

PARAMETRY

Hodnocení výsledků bylo provedeno v souladu s CTS (čl. 5, kapitola 3 IVD směrnice 98/79/EC).

1. LIMIT DETEKCE:

Detekční limit zkoušky byl vypočítán s využitím mezinárodního přípravku HBsAb dodaného CLB jménem WHO (první referenční přípravek 1977, dávka 17-2-77), na který byla kalibrována kalibrační křivka. Jako ředící roztok bylo použito HBV negativní sérum, jak bylo doporučeno dodavatelem. Výsledky kontroly kvality jsou uvedeny v následující tabulce:

WHO mIU/ml	SAB.CE šarže č. 1002	SAB.CE šarže č. 1001	SAB.CE šarže č. 1002/2
50	0,933	0,812	0,846
10	0,219	0,192	0,194
5	0,110	0,096	0,104
2.5	0,057	0,058	0,067
Std 0	0,021	0,015	0,023

2. DIAGNOSTICKÁ SPECIFIČNOST A CITLIVOST

Hodnocení bylo prováděno na celkovém počtu více než 700 vzorků.

2.1 Diagnostická specifita

Je definována jako pravděpodobnost, že vzorky s absencí analytu budou vyhodnoceny jako negativní. Bylo testováno více než 500 negativních vzorků, interně i externě. Diagnostická specifita byla vyhodnocena jako 98,8 %. Kromě toho byla diagnostická specifita hodnocena testováním 113 potenciálně interferujících vzorků (jiné infekční nemoci, pacienti nakažení jaterními nemocemi nevírového původu, pacienti dialyzačních jednotek, těhotné ženy, pacienti s hemolýzou, pacienti trpící lipémií atd.), opět v rámci evropské společnosti. Byla vyhodnocena hodnota specifity 100 %. Nakonec byla ke stanovení specifity použita lidská plazma, odvozená s pomocí různých standardních technik přípravy (citrát, EDTA a heparin) i lidské sérum. Nebyla pozorována žádná nepravá reaktivita vyvolaná způsobem přípravy vzorků.

2.2 Diagnostická citlivost

Je definována jako pravděpodobnost pozitivního výsledku zkoušky v nepřítomnosti konkrétního analytu. Bylo hodnoceno 116 očkovaných pacientů poskytujících diagnostickou citlivost 100 %. Bylo testováno více než 100 pacientů přirozeně nakažených HBV, interně i externě, byla zjištěna diagnostická citlivost 100 %.

3. PŘESNOST

Níže jsou uvedeny průměrné (střední) hodnoty získané ze studie prováděné na třech vzorcích s různou anti-HBsAg reaktivitou, zkoumaných v 16 opakováních ve třech opakováních:

SAB.CE: šarže # 1202

Kalibrátor 0 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,038	0,038	0,039	0,039
Směrodatná odchylka	0,003	0,004	0,005	0,004
CV %	8,8	9,5	11,8	10,0

Kalibrátor 10 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,250	0,243	0,244	0,246
Směrodatná odchylka	0,020	0,023	0,017	0,020
CV %	8,0	9,3	7,0	8,1

Kalibrátor 250 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	2,998	3,000	3,259	3,085
Směrodatná odchylka	0,152	0,151	0,158	0,153
CV %	5,1	5,0	4,8	5,0

SAB.CE: šarže # 1002

Kalibrátor 0 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,048	0,048	0,050	0,049

Směrodatná odchylka	0,005	0,004	0,006	0,005
CV %	9,4	8,4	11,5	9,8

Kalibrátor 10 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,249	0,252	0,242	0,248
Směrodatná odchylka	0,021	0,020	0,023	0,021
CV %	8,3	7,9	9,6	8,6

Kalibrátor 250 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	3,544	3,653	3,612	3,603
Směrodatná odchylka	0,153	0,176	0,138	0,156
CV %	4,3	4,8	3,8	4,3

SAB.CE: šarže # 1002/2

Kalibrátor 0 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,050	0,051	0,050	0,050
Směrodatná odchylka	0,005	0,006	0,006	0,005
CV %	10,0	10,9	11,9	10,9

Kalibrátor 10 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	0,226	0,238	0,239	0,234
Směrodatná odchylka	0,015	0,017	0,018	0,016
CV %	6,5	7,0	7,5	7,0

Kalibrátor 250 mIU/ml (N = 16)

Průměrné hodnoty	První	Druhý	Třetí	Průměrná hodnota
OD 450nm	3,526	3,457	3,499	3,494
Směrodatná odchylka	0,137	0,143	0,162	0,147
CV %	3,9	4,1	4,6	4,2

Variabilita uvedená v tabulkách nevedla ke změně interpretace výsledků.

OMEZENÍ

Kontaminace vzorku bakteriemi nebo deaktivace teplem mohou ovlivnit hodnoty absorbance vzorků s následnou změnou interpretace výsledků. Tento test je vhodný pouze pro zkoušení jednotlivých vzorků a ne pro vzorky hromadné.

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být vyslovována na základě jediného výsledku testu. V úvahu je třeba vzít klinickou historii pacienta, symptomatologii i další diagnostické údaje.

POUŽITÁ LITERATURA

- Engvall E. et al., J.Immunochemistry, 8, 871-874, 1971.
- Engvall E. et al., J.Immunol. 109, 129-135, 1971.
- Remington J.S. and Klein J.O. In "Infectious diseases of the fetus and newborn infant". Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- Volk W.A. In "Essential of Medical Microbiology". 2nd ed., pp 729, G.B.Lippincott Company, Philadelphia, New York, S.Josè, Toronto
- Snydman D.R. et al., Ann.Int.Med., 83 : 838, 1975.
- Barker L.F., Dodd R.J., Sandler S.G.. In "viral Hepatitis: Laboratory and Clinical Science" F.Deinhardt, J. Deinhardt eds., M.Dekker Inc., New York, 215-230, 1983.
- Cossart Y., Brit.Med.Bull., 28: 156, 1972
- Lander J.J. et al., J.Immunol., 106: 1066, 1971

Dok.:	INS SAB.CE/CZ	Strana	8 z 9	Rev.:	Datum: 07/2008JP
-------	---------------	--------	-------	-------	------------------

9. Mushawar I.K. et al., Ann.J.Clin.Pathol., 76: 773, 1981.
10. Howard C.R., Immunol.Today, 5: 185, 1984
11. Aach R.D., Lancet 7874: 190-193, 1974.
12. Jilg W. et al., J.Hepatol. 9 : 201-207, 1988
13. P.Crovari et al., Boll. Ist. Sieroter. Milan., 63: 14-18, 1984
14. M.Davidson et al., J.Natl.Cancer Inst., 59 : 1451-1467, 1977
15. F.Gyorkey et al., J.Natl.Cancer Inst., 59: 1451-1467, 1977
16. S.Hadler et al., N.E.J.Med., 315: 209-214, 1986
17. J.H.Hoofnagle et al., Hepatology, 7: 758-763, 1987
18. C.L.Howard, J.Gen.Virol., 67: 1215-1235
19. W.Jilg et al. J.Hepatol., 6: 201-207, 1988
20. P.Michel et al., Nephrologie, 7: 114-117, 1986
21. W.Szmuness et al., N.E.J.Med., 303: 833-836, 1980
22. P.Tiollais et al., Nature, 317: 489-495, 1985
23. A.J.Zuckermann et al., in "Hepatitis Viruses of Man" Academic Press, London, 1979

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

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

Doc.:	INS SAB.CE	Verze: 2	01/2007
-------	------------	----------	---------

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,

e-mail: laboserv@laboserv.cz

