

## HEV IgM

### A. POUŽITÍ

Enzymatický imunologický test (ELISA) pro detekci IgM protilátek proti viru hepatitidy E v krevní plazmě a krevním séru. Souprava může být použita 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.

Test IgM je používán ke stanovení primárních infekčních agens u pacientů prokazujících symptomy hepatitidy i po vyloučení jiných virových hepatitid (HBV, HDV, HCV).

### 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. IgM protilátky proti HEV, jsou-li obsaženy ve vzorku, se specificky váží na antigen fixovaný na destičce. Po odmytí, nenavázaných komponent, se během druhé inkubace detekují fixované protilátky proti HEV pomocí protilátky proti lidským IgM, které jsou značeny křenovou peroxidázou. Navázaný enzym pak reaguje se směsí chromogenu/substrátu za vzniku zbarvení, jehož intenzita je přímo úměrná množství IgM protilátek proti HEV obsažených ve vzorku.

### 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 žlutě.

#### 3. Pozitivní kontrolní vzorek:

1x2.0ml. Připraveno k přímému použití. Složení: lidské IgM 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. 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.

#### 5. Enzymatický konjugát

1x16ml. Připraveno k přímému použití. Složení: polyklonální protilátky proti lidskému IgM 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.

#### 6. 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.*

#### 7. Stop roztok:

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

#### 8. Ředící roztok vzorků:

2x60 ml. Složení: 2% kasein; 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.1% Tween 20; 0.09% azid sodný a 0.1% Kathon GC.

#### 9. Neutralizační činidlo:

1x8ml Připraveno k přímému použití. Složení: kozí protilátky proti lidskému IgG; 2% kasein; 10mM citrátový pufr o pH 6.0+/-0.1; 0.1% Tween 20; 0.09% azid sodný a 0.1% Kathon GC.

#### 10. Krycí fólie na mikrotitrační destičku.

2 ks

#### 11. 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 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. 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, žilettek). Personál má být proškolen, jako to doporučuje Centrum pro kontrolu chorob (Centre for Disease Control) / Národní institut

zdraví (U.S. Institutes of Health publication) "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984

3. Personál pracující se vzorkem má být vakcinován proti HAV a HBV, a to vakcinami které jsou dostupné, bezpečné a efektivní.

4. Laboratorní prostředí má být kontrolováno tak, aby se zabránilo kontaminaci otevřených lahvíček a mikrotitrační destičky během používání soupravy mikroorganismy z prachu nebo vzduchu. Chromogen/Substrát nevystavujte působení světla.

5. Skladujte soupravu při 2-8 °C v chladničce s kontrolovanou teplotou nebo v chladné místnosti.

6. Nemíchejte reagentie pocházející z různých šarží. Doporučujeme raději nepoužívat ani reagentie ze stejné šarže, ale pocházející z různých souprav.

7. Zkontrolujte, zda jsou všechny reagentie čiré a zda neobsahují viditelné částice nebo shluky. Pokud tomu tak není, použijte k vyšetření novou soupravu.

8. Zabraňte křížové kontaminaci mezi vzorky používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každého vzorku.

9. Zabraňte křížové kontaminaci mezi reagentiemi používáním jednorázových špiček a jejich výměnou po pipetování každé reagentie.

10. Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace celé soupravy i jednotlivých lahvíček.

11. Všechny vzorky jsou potenciálně infekční. Z tohoto důvodu by práce se všemi vzorky lidského séra a všemi reagenty soupravy měly být prováděny podle předpisu Biosafety Level 2, jak doporučuje text Centers for Disease Control/U.S. Institutes of Health publication "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.

12. Doporučujeme používat jednorázové plastové nádoby pro přípravu tekutých komponent nebo pro přenos do automatizovaného pracoviště, aby se zabránilo křížové kontaminaci.

13. Odpad vzniklý během práce se soupravou musí být likvidován v souladu s národními předpisy a zákony, které se týkají laboratorního odpadu – chemických a biologických substancí. Zejména tekutý odpad vzniklý při promývání, který obsahuje zbytky kontrolních roztoků a vzorků, má být ošetřen jako potenciálně infekční materiál a před zařazením do odpadu má být inaktivován. Doporučený postup inaktivace je ošetření 10% chlornanem sodným nebo tepelná inaktivace v autoklávu při 121°C po dobu 20 minut.

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

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

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

## G. PŘÍPRAVA VZORKŮ A DOPORUČENÍ

Souprava je určena k vyšetřování vzorků lidského krevního séra nebo plasmy. Vyhněte se přidávání konzervačních látek do vzorků, které by mohly potlačit enzymatickou reakci konjugátu, což by vedlo k falešně negativním výsledkům.

Vzorky musí být jasně označeny kódem nebo jménem, aby nedošlo k záměně. Pokud je souprava používána pro screening krevních jednotek, velmi doporučujeme označení čárovým kódem a elektronické čtení kódů.

Nepoužívejte hemolyzované a hyperlipemické vzorky, stejně jako vzorky obsahující rezidua fibrinu nebo jiných velkých částic, protože mohou vést k falešným výsledkům.

Vzorky séra mohou být uloženy při teplotě 2–8°C až po dobu pěti dnů od odběru. V případě delšího skladování je uchovávejte zmrazené při teplotě –20°C. Vzorky opakovaně nezmrazujte a nerozmrazujte neboť takto ošetřené vzorky mohou poskytovat falešné výsledky.

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

## H. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A UPOZORNĚNÍ

### 1. Mikrotitrační destička:

Nechejte mikrotitrační destičku vytemperovat na pokojovou teplotu (asi 1 hodinu) před otevřením sáčku. Zkontrolujte vysoušedlo, jestli není zbarveno tmavě zeleně, což svědčí o defektu při skladování. V takovém případě zkontaktujte zákaznický servis firmy Dia.Pro.

Nepoužité stripy musí být vráceny zpět do hliníkového sáčku spolu s vysoušedlem, pevně uzavřeny a skladovány při 2 až 8°C. Zbytek stripů je stabilní až do doby expirace, pokud indikátor vlhkosti obsažený ve vysoušedle nezmění barvu ze žluté do zelená.

### 2. Negativní kontrola:

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

### 3. Pozitivní kontrola:

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

### 4. 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 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.

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

### 5. Konjugát:

Připraven 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.

## 6. 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 reagensie přenášena, pak ať přenášena pouze v plastových, pokud možno sterilních jednorázových nádobách.

## 7. Neutralizační činidlo

Přípraveno k použití. Před použitím pečlivě protřepejte.

## 8. Ředící roztok vzorků:

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

## 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.

## 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 – 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, 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 možnostem křížové kontaminace při opakované dispenzaci jehlou automatu. Používání ELISA automatu je doporučeno, pokud počet vzorků v jednom běhu je nejméně 30.

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

## L. PŘÍPRAVA NA ZPRACOVÁNÍ SOUPRAVY

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

2. Zkontrolujte, zda nejsou tekuté komponenty soupravy kontaminovány viditelnými částicemi nebo sraženinami.

3. Zkontrolujte, zda Chromogen je bezbarvý nebo světle modrý nasátím malého množství sterilní plastovou pipetou.

4. Zkontrolujte, zda při převozu nedošlo k rozbití nějaké lahvičky a zda není uvnitř krabičky vylitá žádná tekutina.

5. Zkontrolujte, zda hliníkový obal mikrotitrační destičky není porušený.

6. Nařed'te si potřebný objem koncentrátu promývacího roztoku, jak je popsáno výše.

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

8. 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.

9. Zkontrolujte, zda je zapnutý ELISA reader anebo se ujistěte, že bude zapnut minimálně 20 min před měřením.

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

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

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

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

## M. VLASTNÍ ANALÝZA

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

1. Předřed'te vzorky 1:101 (př. 1000 µl ředícího roztoku a 10 µl vzorku. Negativní ani pozitivní kontrolu neřed'te, jsou připraveny přímo k použití. Pečlivě promíchejte všechny reagensie na vortexu.

2. Požadovaný počet stripů umístěte do rámečku. První jamku A1 ponechejte prázdnou pro slepý test (BLANK).

3. Pipetujte 50 µl neutralizačního činidla do jamek určených pro vzorky. Nepipetujte jej do jamek určených pro BLANK a kontroly.

4. Dávkujte 100 µl negativní kontroly v duplikátu, 100 µl pozitivní kontroly do určených jamek. Pipetujte 100 µl předředěných vzorků do jednotlivých jamek.

5. Inkubujte destičku 60 minut při +37°C

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

6. Promyjte na automatické promývače 4x300µl promývacího roztoku jak bylo popsáno v bodě I.3.

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

8. Inkubujte destičku 60 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 20 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 zbarvení roztoků jamek ELISA readerem (kap. I.5.) při 450 nm pro odečet pozadí i při 620-630 nm. Jamku A1 použijte jako BLANK.

#### Důležitá poznámka:

1. Pokud nemáte k dispozici druhý filtr, ujistěte se, že se na spodní straně mikrotitračních jamek nenachází žádné otisky prstů před měřením při 450 nm. Otisky můžou způsobit falešně pozitivní výsledky při čtení.

2. Měření musí být provedeno hned po přidání Stop činidla, nejpozději do 20 min po jeho přidání. Samooxidace chromogenu, která se může objevit způsobí silné pozadí.

#### N. SCHÉMA POSTUPU

| Krok                 | Hodnota       |
|----------------------|---------------|
| neutralizační roztok | 50 µl         |
| neg. a poz. kontroly | 100 µl        |
| vzorky (1:101)       | 100 µl        |
| <b>1. inkubace</b>   | <b>60 min</b> |
| Teplota              | +37°C         |
| Promytí              | 4-5 cyklů     |
| Konjugát             | 100 µl        |
| <b>2. inkubace</b>   | <b>60 min</b> |
| Teplota              | +37°C         |
| Promytí              | 4-5 cyklů     |
| substrát TMB         | 100 µl        |
| <b>3. inkubace</b>   | <b>20 min</b> |
| Teplota              | pokojová      |
| Stop roztok          | 100 µl        |
| měření (filtr)       | 450 nm        |

Pipetovací schéma:

|   | 1  | 2   | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|-----|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | B  | S5  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | NC | S6  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | NC | S7  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | PC | S8  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | S1 | S9  |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | S2 | S.. |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | S3 | S.. |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | S4 | S.. |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

Legenda: B - Blank, NC - Negativní kontrola  
PC - Pozitivní kontrola, 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) | < 0.100 OD 450 nm  |
| pozitivní kontrola (PC) | > 0.500 OD 450 nm  |

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

| Problém                                                  | Zkontrolujte                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Blank</b><br>OD > 0.100                               | 1. zda nedošlo ke kontaminaci roztoku substrátu během testu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Negativní kontrola</b><br>OD > 0,100<br>po blankování | 1. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku<br>2. zda byl použit správný promývací roztok a zda jim byla promývačka naplněna před použitím<br>3. zda nebyla udělána chyba při pipetování kontrol (pozitivní kontroly místo negativní)<br>4. zda nedošlo ke kontaminaci NC nebo jamek do nichž byla NC napipetována pozitivním vzorkem nebo ke kontaminaci konjugátu<br>5. zda nebyly kontaminovány mikropipety pozitivním vzorkem nebo konjugátem<br>6. zda nejsou jednotlivé jehly promývačky částečně ucpané |
| <b>Pozitivní kontrola</b><br>OD < 0.500                  | 1. zda byl dodržen pracovní postup<br>2. zda nebyla udělána chyba při pipetování pozitivní kontroly (př. napipetování negativní kontroly místo pozitivní)<br>3. zda promývací postup a nastavení promývačky je v pořádku<br>4. 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. VÝSLEDKY

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

$$\text{Cut-Off} = \text{NC} + 0.250$$

## 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 |
|-----------|--------------|
| < 1.0     | Negativní    |
| 1.0 – 1.2 | Hraniční     |
| > 1.2     | 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 potvrzovány 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. Diagnóza 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: 0.06 – 0.08

Průměr OD450nm: 0.070

Validace: nižší než 0.10 – akceptováno

Pozitivní kontrola OD: 1.589

Validace: vyšší než 0.50 – akceptováno

$$\text{Cut-off} = 0.070 + 0.250 = 0.320$$

Vzorek 1: 0.070 OD450nm

Vzorek 2: 1.690 OD450nm

Vzorek 1 S/Co < 1.0 = negativní

Vzorek 2 S/Co > 1.2 = pozitivní

## R. PARAMETRY

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

### 1. LIMIT DETEKCE:

Limit detekce tohoto testu byl vypočítán pomocí prvního referenčního materiálu WHO pro HEV protilátku (NIBSC kód 95/584). Referenční materiál byl naředěn. Tento materiál by stanoven jako pozitivní i v nižších titrech.

### 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 98%.

Specifita byla dále testována na více než 100 potenciálně interferenčních vzorků (jiné infekční onemocnění, vzorky pozitivní na protilátky proti E. Coli, pacienti s neviróvým 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 100 pozitivních vzorků; byla zjištěna diagnostická sensitivita vyšší než 98%.

#### 2.3. 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 5-15%, při OD450nm, které nevedly ke změně klasifikace vzorku.

## S. OMEZENÍ

Opakovaně falešně pozitivní výsledky byly pozorovány u vzorků s vysokým titrem RF i přes přítomnost neutralizačního činidla. Několikrát zmražené 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

|                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l.<br/>pod dohledem zřízeným systémem řízení jakosti<br/>a prostředí, který splňuje požadavky norem EN ISO<br/>13485 jak je stanovenou NB no. 0318</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                                    |  |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| Vyrábí: Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes Srl.<br>via Columella n° 31 – Milano – Italy |  |  |  |
|------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|

|                             |              |        |         |
|-----------------------------|--------------|--------|---------|
| Doc.:                       | INS EVM.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)