

# HIV Ab&Ag

**Enzymoimunoanalýza pro stanovení  
protilátek proti viru HIV, HIV typu  
1&2&O a antigenu P24 HIV-1  
v lidském séru a plazmě čtvrté generace**

- pouze pro diagnostiku "in vitro"



**DIA.PRO**

**Diagnostic Bioprobes Srl,  
Via Columella n° 31, 20128**

**Milano - Itálie**

Telefon +39 02 27007161,

fax +39 02 26007726,

e-mail: [diapro@tin.it](mailto:diapro@tin.it)

REF IVCOMB.CE  
192 testů

## HIV Ab

### A. POUŽITÍ SOUPRAVY

ELISA souprava je určena k in-vitro diagnostice protilátek pro všechny subtypy HIV-1, HIV-2 a HIV-1 antigenu (p24) v lidském séru nebo plazmě.

Souprava je určena pouze pro **in vitro** diagnostiku v klinických laboratořích a test musí být prováděn odborníkem v oblasti zdravotní péče.

### B. ÚVOD

Epidemiologické důkazy naznačují, že nakažlivé látky přenášené intimním kontaktem, intravenózní aplikací drog nebo používáním infikované krve nebo krevních produktů, vedou k syndromu získaného selhání imunity (AIDS).

Toto onemocnění ovlivňuje imunitu zprostředkovanou T buňkami a vede k vážné lymfopenii a snížené produkci obranyschopnost zajišťujících T-lymfocytů („helper“). Destrukce této populace T-lymfocytů virem způsobuje selhání imunity, což vede ke snížené nebo nedostatečné odpovědi na následné infekce.

Infekce se tudíž stávají závažnějšími a mohou způsobit smrt. V současné době není žádná úspěšná léčba AIDS známa.

Jako původce choroby byl odhalen retrovirus, lidský virus selhání imunity typu 1 (HIV-1).

Také byl izolován blízké příbuzný, avšak odlišný typ viru selhání imunity, označovaný jako HIV-2. Uvedený virus způsobuje onemocnění, které je od AIDS neodlišitelné.

Bylo ukázáno, že sérologická zkřížená reaktivita mezi HIV-1 a HIV-2 se vzorek od vzorku velmi liší.

Tato variabilita vyžaduje, aby byly do testování protilátek na HIV-1 i HIV-2 zahrnuty antigeny.

Přítomnost anti-HIV-1 a/nebo anti-HIV-2 v krvi indikuje možnou infekci HIV-1 a/nebo HIV-2, následkem čehož by taková krev neměla být používána pro transfuze nebo výrobu produktů používaných pro injekce.

### C. PRINCIP TESTU

Syntetické peptidy představující imunodominantní epitopy HIV-1 a HIV-2 i s monoklonální protilátkou proti antigenu p24 ke všem subtypům HIV-1, jsou nataženy na stěny jamek mikrotitrační destičky.

Peptidy a protilátka byly pečlivě vybrány tak, aby postihly screening protilátek a antigenu p24 proti všem podtypům HIV-1, včetně podtypu O a HIV-2. Vzorky séra nebo plazmy jsou přidány do těchto jamek. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky specifické pro HIV-1 a/nebo HIV-2 (IgG, IgM nebo IgA), vytvoří v jamkách s antigeny HIV peptidů stabilní komplexy.

Komplexy antigenů s protilátkou jsou pak identifikovány následným přidáním: (1) biotinylovaných peptidů, biotinylovanou monoklonální protilátkou proti HIV-1 p24, a (2) konjugátu křenové peroxidázy HRP streptavidinu. Hydrolytická aktivita HRP umožňuje tyto komplexy protilátka-antigen kvantifikovat.

Poté se přidá roztok substrátu peroxidázy.

Během inkubace systém v závislosti na množství anti-HIV-1/2 protilátek nebo antigenu HIV-1 p24, modrá, čímž je demonstrována jejich přítomnost či nepřítomnost ve vzorku. Jamky obsahující vzorky negativní na anti-HIV protilátku zůstanou bez zabarvení.

Do každé jamky se přidá stop roztok a výsledné žluté zabarvení se přečte na čtečce mikrotitračních destiček při 450 nm.

### D. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava IVCOMB.CE obsahuje činidla dostačující pro provedení 192 testů (variantně 96, 480, 960).

#### 1. Mikrotitrační destička **MICROPLATE**

2 mikrotitrační destičky, 12 lomitelných stripů s 8 jamkami potaženými HIV se specifickými peptidy gp36, gp41 a gp120 a monoklonální protilátkou proti HIV-1 p24 Ag. Uzavřeno v sáčku se sušidlem.

#### 2. Negativní kontrola **CONTROL**

Lahvička 1x4,0ml. Kontrola připravena k použití. Obsahuje zvířecí sérum negativní na HIV protilátky a negativní proti antigenu p24, a 0,1 % Kathon GC jako konzervant. Negativní kontrola je kódována žluto-hnědě.

#### 3. Pozitivní kontrola HIV-1 Ab **CONTROL 1+**

Lahvička 1x4,0ml. Kontrola připravena k použití. Obsahuje inaktivované sérum pozitivní na HIV1 protilátky, filtrované zvířecí sérum negativní na HIV Ab&Ag a 0,1 % Kathon GC jako konzervant. Pozitivní kontrola je světle zelená.

**Důležitá poznámka:** pozitivní kontrola byla deaktivována využitím B-propionlaktonu BPL/UV. To však plně nemusí zajistit nepřítomnost životaschopných patogenů, a proto je tuto kontrolu v souladu s dobrými laboratorními praktikami nutno považovat za potenciálně nebezpečnou živým organismům.

#### 4. Pozitivní kontrola HIV-2 Ab **CONTROL 2+**

Lahvička 1x4,0ml. Kontrola připravena k použití. Obsahuje inaktivované sérum pozitivní na HIV1 protilátky, filtrované zvířecí sérum negativní na HIV Ab&Ag a 0,1 % Kathon GC jako konzervant. Pozitivní kontrola je kódována tmavě zeleně.

**Důležitá poznámka:** pozitivní kontrola byla deaktivována využitím B-propionlaktonu BPL/UV. To však plně nemusí zajistit nepřítomnost životaschopných patogenů, a proto je tuto kontrolu v souladu s dobrými laboratorními praktikami nutno považovat za potenciálně nebezpečnou živým organismům.

#### 5. Kalibrátor HIV-1 p24 Ag **CAL Ag**

2 lahvičky. Lyofilizované. Obsahuje neinfekční rekombinantní p24 antigen v 10mM fosfátovém pufru o pH 7,0+/-0,2 s 0,3mg/ml gentamycin sulfátem a 0,1% Kathon GC jako stabilizátory. Tato součást je kalibrována dle 1. mezinárodního HIV-1 p24 Ag referenčního vzorku 90/636 NIBSC (ředěného 1:256) a také dle EFS HIV Ag panelu (3015-3022).

**Důležitá poznámka:**

- 1) Kalibrátor obsahuje rekombinantní antigen p24 o koncentraci okolo 100pg/ml.
- 2) Objem nutný k rozpuštění obsahu lahvičky se může lišit dle šarže. Použijte proto správný objem uvedený na štítku lahvičky.

#### 6. Koncentrát promývacího roztoku **WASHBUF** 20X

Lahvička 2x60ml. 20x koncentrovaný roztok. Obsahuje 0,1 % Kathon GC. Jedenkrát ředěný obsahuje promývací pufr fosforečné soli o koncentraci 10 mM a pH 7,0+/-0,2 a 0,05 % Tween 20.

#### 7. Konjugát č. 1 **CONJ 1**

8 lahviček. Lahvička obsahuje lyofilizované biotinylované HIV1&2&0 peptidy gp36, gp41 a gp120 a biotinylované monoklonální protilátky proti antigenu HIV-1 p24. Obsah lahviček resuspendujte v 6ml Konjugátu 1 rozpouštědla.

#### 8. Rozpouštědlo konjugátu 1 **CONJ 1 DIL**

Lahvička 1x45ml. Používá se k rozpuštění lyofilizovaného prášku konjugátu č.1. Obsahuje tris pufr doplněný o 0,05% Kathon GC, Tween 20 a BSA.

#### 9. Konjugát č. 2 **CONJ 2**

Lahvička 1x40ml. Roztok obsahuje HRP konjugovaný se streptavidinem, jako konzervant 0,05% Kathon GC, Tween 20 a BSA. Tato složka je červené barvy.

### 10. Chromogen/substrát SUBS TMB

Lahvička 2x16ml. Složka připravená k použití. Obsahuje 50mM citrátový pufr o pH 3,5-3,8, 4% DMSO, 0,03% TMB a 0,02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Poznámka:** uskladnění je třeba provést v temnu, z důvodu vysoké citlivosti na světlo.

### 11. Kyselina sírová H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 M

Lahvička 1x32ml. Obsahuje 0,3 M roztok H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

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

### 12. Ředidlo vzorku: DILSPE

Lahvička 1x14ml. Obsahuje pufr doplněný o 0,05% Kathon GC, blokátor anti-HAMA a Tween 20; používá se k ředění vzorku. Tato složka je světle modré barvy.

### 13. Krycí fólie 4 ks

### 14. Návod k použití 1ks

### 15. Konjugát č. 1 MIX kontejner

1 prázdný kontejner. Kontejner se používá pouze pro smíchání lyofilizovaného Konjugátu č. 1 a rozpouštědla konjugátu č. 1 před začátkem automatizované analýzy.

### 16. Zátky kontejneru 5 ks

Plastové zátky pro pevné uzavření kontejneru po prvním použití.

## E. POŽADOVANÉ MATERIÁLY NEDODÁVANÉ SE SOUPRAVOU

1. Kalibrované mikropipety (200 ul a 10 ul) a jednorázové plastové špičky.
2. Voda splňující požadavky EIA (dvakrát deionizovaná nebo dvakrát destilovaná, prolitá aktivním uhlím s cílem odstranění oxidačních činidel používaných k dezinfekci).
3. Stopky s rozsahem 60 minut nebo větším.
4. Absorbující papírové kapesníčky.
5. Kalibrovaný termostatický inkubátor ELISA destiček schopný zajistit teplotu +37°C.
6. Kalibrovaná čtečka ELISA destiček s čtením při 450nm a případně s filtry 620-630nm.
7. Kalibrovaná promývačka ELISA destiček.
8. Vortex nebo podobné míchací zařízení.

## F. VAROVÁNÍ A PŘEDBĚŽNÁ OPATŘENÍ

1. Souprava může být používána pouze zručným a vhodně proškoleným technickým personálem, pod dohledem zodpovědného lékaře laboratoře.
2. Pokud soupravu používáme při prověřování krevních jednotek a součástí krve, musí být test prováděn v laboratoři certifikované a kvalifikované státními orgány odpovídajícími za tuto oblast (ministerstvem zdravotnictví nebo podobnou organizací).
3. Veškerý personál zahrnutý do provádění rozboru musí mít na sobě ochranný laboratorní oděv, rukavice bez obsahu mastku a ochranné brýle. Je třeba vyhnout se použití veškerých ostrých (jehly) nebo řezných (nože) prostředků. Veškerý zúčastněný personál musí být proškolen v procedurách biologické bezpečnosti, jak doporučuje Center for Disease Control (Centrum pro kontrolu nemocí), Atlanta, USA a jak je uvedeno v publikaci Národního institutu zdraví (National Institute of Health): "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínálních laboratořích), vydání 1984.
4. Všichni zaměstnanci zahrnutí do manipulace vzorků musejí být očkovaní na HBV a HAV; příslušné vakcíny musejí být dostupné, bezpečné a účinné.
5. Prostředí v laboratoři by mělo být kontrolováno tak, aby neobsahovalo znečišťující látky, jako je prach nebo vzduchem přenášené mikrobiální částice, a to

při otevírání ampulek sestavy a mikrodestiček, jakož i při provádění zkoušek. Chromogen/substrát chraňte před silným světlem a při provádění testu se vyhněte vibracím povrchu lavičky.

6. Po obdržení soupravu uložte při 2 - 8°C do ledničky nebo chladné místnosti s kontrolovanou teplotou.
7. Nezaměňujte komponenty mezi jednotlivými dávkami souprav. Doporučuje se nezaměňovat komponenty mezi dvěma soupravami stejné výrobní dávky.
8. Zkontrolujte čistotu činidel a to, zdali neobsahují viditelné těžké částice nebo shluky. Pokud tomu tak není, požádejte vedoucího laboratoře o zahájení procedur nezbytných pro výměnu soupravy.
9. Vyhněte se vzájemnému znečištění mezi vzorky séra a plazmy a to tak, že budete používat špičky na jedno použití a po každém vzorku je vyměňovat.
10. Vyhněte se vzájemnému znečištění mezi činidly soupravy – používejte nástroje na jedno použití a po každém použití je vyměňujte.
11. Soupravu nepoužívejte po datu expirace vyznačeném na vnějším zásobníku a vnitřních štítcích (ampulek).
12. Všechny vzorky považujte za potenciálně infekční. Se všemi vzorky lidského séra by mělo být manipulováno na úrovni biologické bezpečnosti 2, jak doporučuje Centrum pro kontrolu onemocnění (Center for Disease Control), Atlanta, USA ve shodě s tím, co bylo popsáno v publikaci Zdravotního institutu (Institutes of Health's) nazvané: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínálních laboratořích), vydání 1984.
13. Používání plastových materiálů na jedno použití se doporučuje při přípravě tekutých složek a při přenosu složek do automatizovaných pracovních stanic, abychom se vyhnuli znečištění.
14. Odpad vyprodukovaný během používání soupravy je nutno zlikvidovat ve shodě se státními předpisy a zákony týkajícími se laboratorního odpadu chemické a biologické povahy. Zejména odpad vzniklý z mytí, ze zbytků kontrol a vzorků musí být považován za potenciálně infekční materiál a před vyhozením deaktivován. Jako deaktivace je navržena procedura, kdy je použita 10 % konečná koncentrace domácnostního bělidla po dobu 16-18 hodin; případně je možná tepelná deaktivace v autoklávu při 121°C po dobu 20 min..
15. Havarijní úniky vzorků a operací je třeba absorbovat papírovými kapesníčky, namočenými v domácnostním bělidle a pak ve vodě. Kapesníčky je pak třeba likvidovat ve k tomu určených kontejnerech, používaných pro laboratorní a nemocniční odpad.
16. Kyselina sírová je dráždivá. Pokud se rozlije, ošetřete povrch množstvím vody.
17. Další odpadní materiály vzniklé používáním soupravy (příklad: špičky používané pro vzorky a kontrolu, použité mikrodestičky) by měly být manipulovány jako potenciálně infekční a likvidovány dle státních nařízení a zákonů vztahujících se k laboratorním odpadům.

## G. VZOREK: PŘÍPRAVA A DOPORUČENÍ

1. Krev je odebírána asepticky napíchnutím žíly a plazma nebo sérum se připraví s využitím standardních metod přípravy vzorků pro klinickou laboratorní analýzu. Při přípravě vzorku s citrátem, EDTA a heparinem nebyl pozorován žádný vliv.
2. Vyhněte se jakémukoliv přidávání ochranných látek ke vzorkům; zejména azidu sodného, protože tato chemikálie by ovlivnila enzymatickou aktivitu konjugátu a to by vedlo k falešným, negativním výsledkům.
3. Vzorky je třeba jasně označit kódy nebo názvy, abychom se vyhnuli dezinterpretacím výsledků. Pokud je souprava použita k prověřování krevních jednotek, důrazně doporučujeme štítky s čárovými kódy a elektronické čtení.

4. Hemolyzované (červené) a viditelně hyperlipidemické ("mléčné") vzorky je třeba vyhodit, protože by mohly generovat nepravdivé výsledky. Vzorky obsahující zbytky fibrinu nebo těžké částice či mikrobiální vlákna a částice by se měly vyhodit, protože by mohly vyvolat nepravdivé výsledky.

5. Sérum a plazmu lze uložit při +2° - 8°C po dobu až p ěti dnů od odběru. Pokud je doba skladování delší, je třeba vzorky zmrazit na -20°C a to až po několik měsíců. Žádné zmrazené vzorky by se neměly rozmrazovat / rozpouštět více než jednou, neboť by mohlo dojít ke vzniku částic, které by mohly ovlivnit výsledek zkoušky.

6. Pokud jsou částice přítomny, proveďte filtraci s využitím 0,2-0,8 u filtrů, sloužící k očištění vzorku pro testování.

7. Nepoužívejte vzorky zničené teplem, protože takové by mohly mít nepravou reaktivitu.

#### H. PŘÍPRAVA SLOŽEK A DŮRAZNÁ UPOZORNĚNÍ

Studie provedená na otevřené soupravě neprokázala žádnou odpovídající ztrátu aktivity po dobu až 2 měsíců.

##### Mikrodestičky:

Před zprovozněním zásobníku umožněte mikrodestičce dosáhnout pokojové teploty (okolo 1 hod). Zkontrolujte, zda není poškozena kapsička a že se nevyskytuje žádný defekt, který by ukazoval na problémy s uskladněním. V takovém případě volejte zákaznický servis Dia.Pro. Nepoužité stripy je třeba vrátit zpět do hliníkové kapsičky, spolu se sušidlem ji pak pevně zavřít zipem a uložit při +2° - 8°C. P ěi prvním otevření jsou zbylé stripy stabilní po dobu až dvou měsíců.

##### Negativní kontrola:

Připravena k používání. Před použitím dobře zamíchejte ve vířivce.

##### Pozitivní kontrola Ab:

Připravena k používání. Před použitím dobře zamíchejte ve vířivce. K této složce přistupujte jako k potenciálně infekční; dokonce i tehdy, pokud byl HIV (byl-li při kontrole zjištěn) chemicky deaktivován.

##### Kalibrátor Ag:

Lyofilizovaný kalibrátor Ag obsahuje neinfekční rekombinantní antigen p24. Objem vody odpovídající normě EIA použité pro jeho ředění a pro dosažení správné koncentrace p24 (okolo 100 pg/ml) je uvedeno na štítku lahvičky. Pro usnadnění rozpuštění lyofilizovaného peletu použijte vertex na několik minut a v pravidelných intervalech. Kompletního rozpuštění dosáhnete v průběhu 2-5 minut.

##### Koncentrát mycího pufru:

Tento 20x koncentrovaný roztok je třeba rozpustit s vodou třídy EIA až 1 200 ml a před použitím jemně zamíchat od jednoho okraje ke druhému. Vzhledem k tomu, že se v ampulce (nádobce) mohou vyskytovat krystaly, dbejte na to, abyste při přípravě roztoku pečlivě rozpustili veškerý obsah.

Při přípravě se vyhněte vzniku pěny, neboť přítomnost bublin by mohla snížit účinnost praní.

**Poznámka:** po rozpuštění je mycí (prací) roztok stabilní po dobu jednoho týdne při +2 - 8°C.

##### Konjugát č. 1:

Roztok konjugátu č. 1 je třeba připravit těsně před zahájením testu. Přidejte 6 ml Konjugátu 1 rozpouštědla přímo do lahvičky Kojugátu č.1 pro rozpuštění lyofilizovaného prášku. Toto množství (celkem 6 ml v lahvičce) je dostatečné pro 32 testů nebo 4 kompletní stripy mikrotitrační destičky. Pro usnadnění rozpuštění lyofilizovaného prášku použijte vertex v pravidelných intervalech.

**Důležitá poznámka:** jakýkoliv nepoužitý podíl tohoto zředěného roztoku konjugátu č. 1 lze uschovat při 2 °C

**až 8 °C po dobu ne delší než 12 hodin. Po této době je nutné roztok vyhodit, prázdný použitý kontejner promyjte vodou odpovídající normě EIA a uchovejte v suchu pro další použití.**

##### Konjugát č.2:

Reagencie je připravena k použití. Před použitím dobře promíchejte.

##### Chromogen/substrát:

Připraven k použití. Před použitím dobře zamíchejte na míchadle.

Dbejte, abyste kapalinu neznečistili oxidujícími chemikáliemi, vzduchem přenášeným prachem nebo mikroby.

Nevystavujte silnému osvětlení, oxidačním činidlům nebo kovovým povrchům.

Pokud je nutné tuto složku převést, používejte pouze plasty, možný je sterilní zásobník na jedno použití.

##### Kyselina sírová:

Připravena k použití. Před použitím dobře zamíchejte na míchadle.

Pozor: dráždivá (Xi R36/38; S2/26/30)

Legenda: R 36/38 = dráždí oči a pokožku.

S 2/26/30 = v případě zasažení očí je okamžitě vymyjte množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.

##### Ředící roztok vzorků:

Připraveno k použití. Před použitím dobře promíchejte na vortexu.

#### I. INSTRUMENTY A NÁSTROJE POUŽÍVANÉ SPOLU SE SOUPRAVOU

1. Mikropipety je třeba kalibrovat tak, aby poskytovaly přesný objem požadovaný pro vyšetření, a je třeba podrobit je pravidelné dekontaminaci (přírodní líh, 10 % roztok bělidla, nemocniční dezinfekční prostředky) těch částí, které by v případě nehody mohly přijít do kontaktu se vzorkem. Také je třeba pravidelně je udržovat, aby vykazovaly přesnost 1 % a pravdivost +/-2 %. Dekontaminace rozlivů nebo zbytků komponent sestavy by se měla pravidelně provádět také.
2. Inkubátor ELISA je třeba nastavit na +37°C (tolerance +/-0,5°C) a pravidelně kontrolovat, aby bylo možné zajistit udržování požadované teploty. Pro inkubace jsou vhodné suché inkubátory i vodní lázně, se zajištěním validace instrumentů pro inkubaci testů ELISA.
3. Pro konečný výsledek zkoušky je mimořádně důležitá promývačka ELISA. Myčku je třeba pečlivě ratifikovat a přesně optimalizovat, s využitím kontrolních prvků soupravy a referenčních panelů, a to ještě před použitím soupravy pro běžné laboratorní testy. Pro zajištění průběhu zkoušky v souladu s očekáváním obvykle postačuje 4-5 mycích cyklů (nasátí + dispenciaci 350 ul/jamku pracího roztoku = 1 cyklus). Mezi cykly se doporučuje doba ohřevu 20-30 sekund. Aby bylo možno přesně nastavit jejich počet, doporučuje se zkoušku provést s kontrolními prvky soupravy a dobře charakterizovanými negativními i pozitivními referenčními vzorky, a také provést kontrolu pro dosažení hodnot popsaných níže v části Interní kontrola kvality. Pravidelnou kalibraci dodávaných objemů myčkou a na základě její údržby (dekontaminace a čištění jehel) je třeba provádět podle pokynů výrobce.
4. Inkubační doby mají toleranci ±5%.
5. Čtečku mikrodestiček ELISA je třeba vybavit čtecím filtrem 450 nm a v ideálním případě také druhým filtrem (620-630 nm) pro účely zatemňování. Její standardní výkon by měl být (a) šířka pásma ≤ 10 nm; (b) rozsah absorbance od 0 do ≥ 2,0; (c) linearita

do  $\geq 2,0$ ; reprodukovatelnost  $\geq 1$  %. Zatemňování se provádí v jamce uvedené v části "Procedura zkoušení". Optický systém čtečky je třeba pravidelně kalibrovat, aby bylo možno zajistit, že bude měřena ta správná optická hustota. Je třeba věnovat mu pravidelnou údržbu podle pokynů výrobce.

- Při použití ELISA automatu je třeba všechny kritické kroky (dispenzaci, inkubaci, mytí, čtení, manipulaci s daty) pečlivě nastavit, zkalibrovat, zkontrolovat a provádět pravidelný servis, aby bylo možno dosáhnout hodnot uvedených v části Interní kontrola kvality. Zkušební protokol je třeba nainstalovat do operačního systému jednotky a potvrdit jeho platnost pro myčku i čtečku. Kromě toho je třeba potvrdit platnost části stanice pro manipulaci s kapalinou (dispenzací a mytí) a přesně ji nastavit. Obzvláštní pozornost je nutné věnovat tomu, abychom se vyhnuli přenesení jehlami používanými pro dispenzací a mytí. To je třeba prostudovat a zkontrolovat, aby bylo možno minimalizovat možnost znečištění přilehlých jamek. Použití automatizovaných pracovních stanic ELISA se doporučuje pro prověřování krve tam, kde je počet vzorků, které je třeba otestovat, vyšší než 20-30 jednotek na jeden běh.
- Při použití automatu DP1 ScreenEasy dodržujte instrukce dané výrobcem zařízení.
- Při používání automatických zařízení, v případě, kdy držák ampulky (nádobky) instrumentu nesedí s ampulkami dodanými v soupravě, roztok převedte do vhodných zásobníků a tyto označte štítkem stejně jako bylo uvedeno na původní ampulce (nádobce). Tento krok je důležitý, abychom se vyhnuli zaměnění obsahu ampulek při manipulaci s nimi. Jakmile je test hotov, vraťte druhotně oštitkované zásobníky do prostředí s 2 - 8°C a dohlédněte, aby byly pevně uzavřené.
- Zákaznický servis Dia.Pro nabízí uživatelům pomoc při nastavení a kontrole instrumentů používaných v kombinaci se soupravou, aby bylo možno zajistit shodu s popsány požadavky. Je také podporována instalace nových instrumentů, které mají být ve spojení se soupravou použity.

#### L. KONTROLA A ČINNOSTI PŘED ANALÝZOU

- Zkontrolujte dobu použitelnosti soupravy vyčištěnou na vnějším štítku krabičky se soupravou. Pokud je souprava prošlá, nepoužívejte ji.
- Ověřte, zda tekuté složky nejsou znečištěny okem viditelnými částicemi nebo shluky. Zkontrolujte bezbarvosť nebo světle modré zabarvení Chromogenu / substrátu a to tak, že jeho malé množství nasajete sterilní transparentní plastickou pipetou. Zkontrolujte, že během přepravy nevzniklo žádné poškození a že uvnitř krabice není žádný rozliv kapaliny. Prověřte, zda hliníkový váček obsahující mikrodestičku není propíchnutý nebo poškozený.
- Veškerý obsah naředte 20x koncentrovaným pracím (mycím) roztokem, jak je popsáno výše.
- Rozpusťte Kalibrátor Ag.
- Rozpusťte konjugát č. 1 obsahující lyofilizovaný prášek v Konjugát č.1 rozpouštědla (1 lyofilizovaný konjugát č.1 + 6 ml Kojugát č. 1 rozpouštědla) pro dosažení směsi konjugátu č.1 jako je popsáno v odpovídajícím odstavci.
- Všem dalším složkám umožněte dosáhnout pokojovou teplotu (okolo 1 hod) a pak je promíchejte, jak je popsáno.
- Inkubátor ELISA destiček nastavte na +37°C a připravte myčku ELISA tak, že ji dle pokynů výrobce naplníte rozředěným mycím roztokem. Nastavte správný počet pracích cyklů, jak lze zjistit z validace instrumentu týkající se jeho používání se soupravou.
- Zkontrolujte, že byla zapnuta čtečka ELISA a to nejméně 20 minut před čtením.
- Pokud používáte automatizovanou pracovní stanici, zapněte ji, zkontrolujte nastavení a ujistěte se, že

používáte správný zkušební protokol.

- Zkontrolujte, zda jsou na správný objem nastaveny mikropipety.
- Zkontrolujte, zda je veškeré ostatní vybavení dostupné a připravené k používání.
- Pokud se vyskytnou problémy, v testu dále nepokračujte a kontaktujte vedoucího.

#### M. PRŮBĚH ANALÝZY

Analýzu je třeba provádět podle pokynů uvedených dále a dbát přitom na to, abychom pro všechny testované vzorky dodržovali stejnou inkubační dobu.

##### 1. Automatizovaná analýza:

Pokud je test prováděn automaticky se systémem ELISA, navrhuje se nejprve provést přípravu instrumentu s 50 ul rozpouštědla vzorku a poté 150 ul kontrolu a vzorky. Před nasátím dalšího vzorku je třeba důkladně omýt jehly, abychom se vyhnuli vzájemnému znečištění mezi vzorky nebo špičkami, které mají být vyměněny. Při dalších operacích se řiďte provozními pokyny popsány níže pro manuální zkoušení. Důrazně doporučujeme zkontrolovat, že časový překryv mezi dispenzací prvního a posledního vzorku bude počítán instrumentem a vzat v úvahu odpovídajícím odsunutím první operace praní (mytí).

##### Manuální provedení:

- Předtím, než rozdělíte vzorky a kontroly testu do jamek, rozpusťte správné množství lyofilizovaného konjugátu č.1 v Konjugát č.1 rozpouštědla.
- Umístěte požadované množství stripů do držáku mikrotitračních destiček. První jamku zanechte prázdnou pro operaci zatemňování (přípravu polotovaru).
- Dávkujte 50 ul rozpouštědla vzorku do každé jamky s výjimkou A1 používané pro blank (přípravu polotovaru).
- Pak přidejte 150 ul negativní kontroly v triplikátu, 150 ul HIV1 pozitivní kontroly, 150 ul HIV2 pozitivní kontroly a 150ul kalibrátoru Ag v duplikátu do příslušných jamek.
- Do každé správně označené jamky přidejte 150 ul vzorku. Destičku míchejte jemně na pracovním povrchu a vyhněte se přetečení a znečištění sousedních jamek, s cílem plného rozptýlení vzorku do rozpouštědla.
- Mikrotitrační destičku inkubujte po dobu **60 min při +37°C**.

**Důležitá poznámka:** *stripy je třeba zatěsnit lepicí těsnící fólií pouze v případě manuálního zpracování testu. V případě použití automatu stripy nezakrývejte.*

- Mikrodestičku promyjte automatickou promývačkou přidáním a odsátím 350ul ředěného promývacího roztoku do každé jamky, jako je uvedeno v odst. I.3.
- Pipetujte 15 ul směsi konjugátu č. 1, připraveného, jak je popsáno dříve, do každé jamky s výjimkou první, určené pro blank a destičku přikryjte fólií.

**Důležitá poznámka:** *dbejte, abyste se nedotkli vnitřního plastového povrchu jamky špičkou naplněnou konjugátem. Mohlo by to vést ke kontaminaci.*

- Destičku inkubujte po dobu **30 min při teplotě +37°C**.
- Pipetujte 100 ul konjugátu č. 2 do všech jamek s výjimkou A1 a jemně zamíchejte.

**Důležitá poznámka:** *uvedený roztok je třeba přidat do spodní části každé jamky, aby bylo zajištěno odpovídající provedení. Neadekvátní promíchání těchto dvou roztoků (konjugátu 1 a konjugátu 2) může snížit navázání streptavidinu HRP (konjugát 2) na biotinylované peptidy a*

následně ovlivnit provádění analýzy. Ujistěte se, že jste při přidání konjugátu č. 2 zajistili adekvátní míchání v případě manuální i automatizované procedury.

- Inkubujte zakrytou mikrodestičku po dobu **30 min při teplotě + 37°C**.
- Promyjte jako v části 7.
- Přidejte 200 ul směsi Chromogenu / substrátu do každé jamky včetně jamky určené pro blank. Poté mikrodestičku inkubujte při **pokožkové teplotě (18-25°C) po dobu 30 minut**. Odpočítávání času zahajte okamžitě po přidání této složky do první jamky.

**Důležitá poznámka:** nevystavujte silnému, přímému světlu. Může způsobit vysokou hodnotu pozadí.

- Pro zastavení enzymatické reakce pipetujte 100 ul kyseliny sírové do všech jamek, s využitím stejného pořadí pipetování, jako v kroku 13. Přidání kyseliny zabarví pozitivní kontrolu a pozitivní vzorky z modré na žlutou.
- V každé jamce změřte intenzitu barvy roztoku, jak je popsáno v části I.5, při filtru 450 nm (čtení) a snad také i při 620-630 nm (odečet pozadí). Jako blank použijte jamku A1.

**Důležité poznámky:**

- Pokud nemáte k dispozici druhý filtr, pohlíďte, aby na dně mikrojamky nebyly před provedením odečtu při 450 nm žádné otisky prstů. Otisky prstů mohou při odečtu generovat falešné pozitivní výsledky.
- Odečet je třeba provést bezprostředně po přidání stop roztoku a v každém případě ne později než 30 minut po jeho přidání. Jinak se může objevit samovolná oxidace chromogenu, která může vést k vysoké hodnotě pozadí.

**N. SCHÉMA ZKOUŠKY**

Metoda	Operace
Rozpouštědlo vzorku	50 ul
Kontroly a kalibrátory	150 ul
Vzorky	150 ul
<b>První inkubace</b>	<b>60 min</b>
Teplota	+37°C
Promývání	4-5 cyklů
Konjugát č. 1	150 ul
<b>Druhá inkubace</b>	<b>30 min</b>
Teplota	+37°C
Konjugát č. 2	100 ul
<b>Třetí inkubace</b>	<b>30 min</b>
Teplota	+37°C
Promývání	4-5 cyklů
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 ul
<b>Čtvrtá inkubace</b>	<b>30 min</b>
Teplota	pokožková
Kyselina sírová	100 ul
Odečet OD	450nm

Následuje příklad schématu rozdělení:

**Mikrodestička**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	V1										
B	NK	V2										

C	NK	V3										
D	NK	V4										
E	POZ 1	V5										
F	POZ 1	V6										
G	POZ 2	V7										
H	POZ 2	V8										

Legenda: BLK = prázdný NK = negativní kontrola POZ2 = HIV2 pozitivní kontrola V = vzorek  
POZ 1 = HIV1 pozitivní kontrola

**O. INTERNÍ KONTROLA KVALITY**

Prověřují se kontrolní prvky a kalibrátor, a to při každém použití soupravy k ověření hodnot OD450nm, zda jsou ve shodě s hodnotami očekávanými a popsány v následující tabulce.

Kontrola	Požadavky
Prázdná jamka	≤ 0,100 OD450nm
Negativní kontrola (NK)	≤ 0,150 OD450nm po blankování. Absorbance jednotlivých negativních kontrol musí být ≤ 0,200. Pokud je hodnota mimo rozsah, vyřadte ji a spočítejte průměr znova. Pokud jsou mimo rozsah dvě hodnoty, analýza musí být zopakována.
HIV-1 Ab pozitivní kontrola	Průměr OD450nm ≥ 0,700.
HIV-2 Ab pozitivní kontrola	Průměr OD450nm ≥ 0,700.
HIV Ag Kalibrátor	S/Co > 1

Pokud výsledky testu splňují požadavky uvedené výše, přejděte k další části.

Pokud je nesplňují, postupujte následovně:

Problém	Zkontrolujte, že...
<b>Blank</b> > 0,100 OD450nm	1. se roztok chromogen / substrát během analýzy neznečistil
<b>Negativní kontrola (NC)</b> > 0,150 OD450nm po blankování	1. jsou promývání uvedené v odst. M a nastavení promývačky stejné 2. byl použit vhodný promývací roztok a promývačka jím byla před použitím propláchnuta; 3. při analýze nebyla udělána žádná chyba (přidání pozitivní kontroly namísto kontroly negativní); 4. nedošlo ke kontaminaci negativní kontroly nebo jamek pozitivními vzorky nebo enzymovým konjugátem 5. se mikropipety neznečistily pozitivními vzorky nebo enzymovým konjugátem 6. jehly promývačky nejsou zablokovány nebo jím není zčásti bráněno v činnosti.
<b>Pozitivní kontroly</b> < 0,700 OD450nm	1. byla procedura správně provedena; 2. při dávkování kontrol nebyla udělána chyba (přidání negativní kontroly namísto kontroly pozitivní. V takovém případě bude mít negativní kontrola také hodnotu OD450nm > 0,200). 3. jsou promývání uvedené v odst. M a nastavení promývačky stejné 4. nedošlo k externímu znečištění pozitivní kontroly

<b>HIV Ag Kalibrátor</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>byla procedura správně provedena</li> <li>při dávkování kontrol nebyla udělána chyba (přidání negativní kontroly namísto kalibrátoru Ag. V tomto případě bude mít negativní kontrola také hodnotu 0,200 OD450nm)</li> <li>jsou promývání uvedené v odst. M a nastavení promývačky stejné</li> <li>nedošlo k externímu znečištění pozitivní kontroly</li> <li>lyofilizovaný prášek se správně rozpustil v odpovídajícím množství vody uvedeném na štítku</li> </ol>
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Pokud se tyto problémy vyskytnou, popište po provedení kontroly všechny zbylé potíže vedoucímu, který podnikne další opatření.

#### P. VÝPOČET CUT-OFF

Výsledky analýzy se počítají pomocí mezní hodnoty stanovené dle následujícího vzorce jako průměr hodnot OD450nm negativní kontroly (NK):

#### NK + 0,125 = cut-off (Co)

Hodnota, zjištěná pro test, se používá k interpretaci výsledků, jako je popsáno v následující části.

**Důležitá poznámka:** po dokončení výpočtu výsledků ELISA automatu se ujistěte, že k výpočtu cut-off bylo použito správného vzorce a získané výsledky interpretujte správným způsobem.

#### Q. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky testu se interpretují jako poměr vzorku OD450nm a hodnoty cut-off (neboli S/Co) dle následující tabulky:

S/Co	Interpretace
< 1	Negativní
> 1	Pozitivní

Negativní výsledek indikuje, že pacient nebyl nakažen HIV.

Pokud se úvodní hodnota absorbance rovná hodnotě cut-off nebo je větší, vzorek znovu otestujte v duplikátu. Pokud budou obě hodnoty z opakovaného testování menší než hodnota cut-off, není interpretace reaktivní na HIV protilátky a/nebo antigen (negativní).

Pokud jsou jedna nebo obě hodnoty z opakovaného testování rovny nebo větší než hodnota cut-off, je interpretace výsledků testů opakovaně reaktivní.

Vzorek by měl být považován za reaktivní nebo pozitivní na HIV protilátky a/nebo antigen podle kritérií tohoto HIV ELISA testu.

Pozitivní výsledek znamená nakažení HIV a k pacientovi by tak mělo být přistupováno odpovídajícím způsobem.

#### Důležité poznámky:

- Interpretace výsledků by se měla provádět pod dohledem vedoucího laboratoře, aby bylo sníženo riziko chyb při posuzování a v interpretaci.
- Opakovaně reaktivní vzorky by před stanovením diagnózy HIV měly být postoupeny k potvrzující analýze.
- Při převodu výsledků z laboratoře do informačního centra je třeba věnovat pozornost tomu, abychom se vyhnuli chybnému převodu dat.
- Diagnózu nákazy HIV může provést a pacientovi sdělit pouze kvalifikovaný lékař.

Příklad výpočtu je uveden níže:

Následující údaje nesmějí být použity namísto skutečných dat získaných uživatelem.

Negativní kontrola: 0,110 – 0,120 – 00115 OD450nm

Průměrná hodnota: 0,115 OD450nm

Nižší než 0,200 – přijato

HIV 1 Ab pozitivní kontrola: 2,000 OD450nm - průměrná hodnota

Vyšší než 0,700 – přijato

HIV 2 pozitivní kontrola: 2,200 OD450nm - průměrná hodnota

Vyšší než 0,700 – přijato

Kalibrátor Ag: 0,322 OD450nm – průměrná hodnota

S/Co > 1 přijat

Cut-off = 0,115 + 1,125 = 0,240

Vzorek 1: 0,070 OD450nm

Vzorek 2: 1,690 OD450nm

Vzorek 1 S/Co < 1 = negativní

Vzorek 2 S/Co > 1 = pozitivní

#### R. PARAMETRY

Hodnocení provedení analýzy bylo provedeno v externím centru pro HIV diagnózu, které zkoušelo soupravu na vzorcích pozitivních a negativních na protilátky proti HIV na soupravě s CE-certifikátem používaných v referenční laboratoři, a také v laboratořích společnosti DiaPro.

#### 1. LIMIT DETEKCE

Limit detekce analýzy byl stanoven na základě průměrných hodnot vzorků specifických pro HIV-1 a HIV-2 protilátky a antigen HIV-1 p24. Testování bylo podpořeno společností NIBSC Blanche Lane South Mimms Potters Bar Hertfordshire EN6 3QG, UK.

Vzorky byly rozpuštěny v HIV Ab&Ag negativní plazmě v duplikátu, aby byly zjištěny diluční křivky.

Tabulky níže uvádějí průměrné hodnoty OD450nm a index S/Co:

#### Vzorek NIBSC anti-HIV 2 monitor

Kód 99/674 – 005

Sample	Lot #	0506		0706		0906	
		OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1x	over	>14.5	over	>15.0	over	>15.1	
2x	3.838	14.1	3.765	14.5	3.774	14.4	
4x	2.371	8.7	2.268	8.7	2.319	8.9	
8x	1.253	4.6	1.097	4.2	1.140	4.4	
16x	0.700	2.6	0.712	2.7	0.735	2.8	
32x	0.462	1.7	0.439	1.7	0.483	1.8	
64x	0.281	1.0	0.260	1.0	0.294	1.1	
128x	0.189	0.7	0.171	0.7	0.174	0.7	
diluent	0.140	0.5	0.122	0.5	0.131	0.5	

Souprava vykazuje limit při ředění 64x.

#### NIBSC Britský standard pro anti HIV 1

Kód 99/750 – 007

Sample	Lot #	0506		0706		0906	
		OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1x	2.206	8.1	2.086	8.0	2.142	8.2	
2x	0.999	3.7	0.925	3.6	1.027	3.9	
4x	0.475	1.7	0.486	1.9	0.486	1.9	
8x	0.295	1.1	0.301	1.2	0.289	1.1	
16x	0.212	0.8	0.205	0.8	0.220	0.8	
diluent	0.140	0.5	0.122	0.5	0.131	0.5	

Souprava IVCOMB.CE vykazuje limitní hodnotu při ředění 8x.

#### NIBSC Britský standard pro anti HIV 1

Kód 99/710 – 007

Sample	Lot #	0506	Lot #	0706	Lot #	0906
Dilution	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1x	0.588	2.2	0.611	2.4	0.607	2.3
2x	0.301	1.1	0.309	1.2	0.312	1.2
4x	0.198	0.7	0.210	0.8	0.192	0.7
diluent	0.140	0.5	0.122	0.5	0.131	0.5

Souprava vykazuje limitní hodnotu při ředění okolo 2x.

#### Monitorovací vzorek NIBSC HIV-1 p24 Antigen Kód 02/146 – 002

Sample	Lot #	0506	Lot #	0706	Lot #	0906
Dilution	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1x	3.664	13.4	3.650	14.0	3.552	13.5
2x	2.151	7.9	2.133	8.2	2.086	8.0
4x	1.209	4.4	1.178	4.5	1.214	4.6
8x	0.734	2.7	0.729	2.8	0.780	3.0
16x	0.388	1.4	0.342	1.3	0.351	1.3
32x	0.259	0.9	0.236	0.9	0.229	0.9
diluent	0.140	0.5	0.122	0.5	0.131	0.5

Souprava vykazuje limitní hodnotu při ředění okolo 16x.

#### NIBSC 1.mezinárodní referenční reagentie pro HIV1Ag Kód 90/636 – (verze 2,31 březen 2004)

Sample	Lot #	0506	Lot #	0706	Lot #	0906	
Dilution	Arb.U	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co	OD450nm	S/Co
1x	1000	over	>14.6	over	>16.0	over	>16.1
2x	500	over	>14.6	over	>16.0	over	>16.1
4x	250	over	>14.6	over	>16.0	over	>16.1
8x	125	over	>14.6	over	>16.0	over	>16.1
16x	62.5	over	>14.6	over	>16.0	over	>16.1
32x	31.5	2.698	8.8	2.547	8.8	2.584	8.8
64x	15.6	1.342	4.8	1.277	4.8	1.325	5.0
128x	7.8	0.775	2.8	0.724	2.8	0.739	2.8
256x	3.9	0.447	1.8	0.438	1.7	0.451	1.7
512x	1.9	0.299	1.1	0.287	1.1	0.296	1.1
1024x	0.97	0.199	0.7	0.175	0.7	0.184	0.7
diluent		0.140	0.5	0.122	0.5	0.131	0.5

Souprava vykazuje limitní hodnotu při ředění okolo 512x.

## 2. DIAGNOSTICKÁ SPECIFITA A CITLIVOST

### 2.1 Diagnostická specifita

Diagnostická specifita soupravy byla zjišťována na populaci více než 500 anonymních dárců krve. Následně byla testována populace více než 200 hospitalizovaných pacientů, kteří byli vyšetřeni na patologii bez HIV.

Diagnostická specifita byla hodnocena testováním více než 100 potenciálně interferujících vzorků (jiné infekční onemocnění, pozitivní na protilátky E.coli, pacienti ovlivnění nevírovou hepatitidou, pacienti s dialýzou, těhotné ženy, hemolýzy, lipémie, atd.).

V průběhu metody zpracování vzorku nebyla pozorována žádná falešná pozitivita. Ke stanovení hodnoty specifity byly použity jak plazma, získané různými standardními technikami (citrát, EDTA a heparin), tak sérum.

Byly testovány také zmrazené vzorky pro zjištění interferencí způsobených skladováním.

Nebyly pozorovány žádné interference.

### 2.2 Diagnostická citlivost

Diagnostická citlivost testu byla stanovena na populaci HIV pozitivních vzorků.

Výsledky pro některé mezinárodní panely jsou uvedeny níže v tabulkách.

#### Ettablissement Francais du Sang

##### Provedení směsný titr

##### Panel HIV Ab (1-6) šarže 11

Vzorek	Složení
1	HIV2 (1/200)
2	HIV2 (1/800)
3	Negativní
4	HIV1 (1/700)
5	HIV1 (1/160)
6	HIV1 (1/200)

vzorek	Šarže 0506	Šarže 0706	Šarže 0906	S/Co
ID	S/Co	S/Co	S/Co	Průměr
1	>14,5	>15,0	>15,1	>14,9
2	10,0	10,2	10,2	10,1
3	0,4	0,4	0,4	0,4
4	8,9	9,0	9,1	6,0
5	>14,5	>15,0	>15,1	>14,9
6	1,9	1,9	1,8	1,9

#### BBI Anti-HIV 1 Nízký Titr

##### Panel provedení – PRB 108

Člen (ID)	IVCOMB.CE S/Co
1	3,5
2	0,5
3	2,3
4	11,4
5	3,8
6	6,9
7	4,0
8	7,5
9	6,3
10	2,4
11	8,8
12	4,1
13	3,7
14	7,2
15	10,9

#### Ettablissement Francais du Sang

##### Panel provedení

##### HIV Ag (3015-3022) šarže 2004

vzorek	IVCOMB.CE Šarže 0506 S/Co	Koncentrace HIV 1 p24 Ag (pg/ml)
3015	8,7	500
3016	4,2	250
3017	1,8	100
3018	1,2	50
3019	0,9	25
3020	0,6	10
3021	0,6	5
3022 (diluent)	0,5	diluent

Následně byly hodnoceny za použití IVCOMB.CE, šarže 0508, některé panely sérokonverze, získané od BBI, USA. V tabulce níže jsou uvedeny výsledky získané ze vzorků obsahujících protilátky HIV 1/2/0 a/nebo antigen HIV-1 p24.

Panel sérokonverze	IVCOMB.CE 4.generace HIV Ab&Ag	IVAB.CE 3.generace HIV Ab
ID	První vzorek v panelu detekovaný jako pozitivní	První vzorek v panelu detekovaný jako pozitivní
PRB926	3	5



PRB927	2	3
PRB930	2	3
PRB931	6	6
PRB933	2	2
PRB935	6	7
PRB941	4	5
PRB942	4	Bez detekce
PRB944	3	5
PRB946	3	Bez detekce
PRB948	4	Bez detekce
PRB950	3	4
PRB952	3	5

Souprava vykazuje vyšší citlivost než předchozí generace v případech, že je schopná detekovat antigen p24.

Výsledky ověření přesně korelují s hodnotami, které zjistila EU CTS a jsou uvedeny v tabulce níže:

<b>Diagnostická citlivost</b>	100%
<b>Diagnostická specifita</b>	≥ 99,5%

### 3. REPRODUKOVATELNOST

Reprodukovatelnost soupravy byla stanovena zjištěním hodnot v rámci jednoho běhu a mezi jednotlivými běhy. V tabulce níže jsou uvedeny výsledky pro negativní vzorky a slabě pozitivní vzorky.

Průměrná hodnota N=48	Negativní vzorek	Slabě pozitivní vzorek
OD450nm	0,136	0,916
Odchylka	0,011	0,022
Směrodatná odchylka %	7,6	4,0

### S. OMEZENÍ STANOVENÍ

Uživatel soupravy je povinen pečlivě přečíst tento příbalový leták. Přesné dodržování protokolu je nutné pro dosažení spolehlivých výsledků. Přesné pipetování vzorků a reagensů i opatrné promývání a časování inkubačních kroků je nutné pro přesnou a opakovatelnou detekci protilátek HIV-1 a HIV-2 a antigenu HIV-1p24.

Po dokončení EIA testu potvrďte opakovaně pozitivní vzorky dalším použitím western blotu (WB), imunofluorescenční (IFA), radioimunoprecipitací (RIPA) nebo metodou PCR na přítomnost nukleové kyseliny HIV. Stanovení, kde pacientské sérum obsahuje protilátky proti HIV nebo antigen p24, znamená výrazné lékařské, sociální, fyziologické i ekonomické komplikace.

Doporučuje se diskretnost, patřičné poradenství a lékařské vyhodnocení považovat jako podstatný aspekt testování.

AIDS a AIDS příbuzné podmínky jsou klinická onemocnění a jejich diagnóza může být stanovena klinicky.

**Samotné EIA testování nemůže být použito ke stanovení diagnózy AIDS.**

Nereaktivní výsledek testu v žádném případě nevylučuje možnost expozice nebo infekce HIV.

Riziko asymptomatické osoby, která je opakovaně reaktivní s rozvinutým onemocněním AIDS nebo příbuznou chorobou není známé.

U testu této povahy mohou být pozorovány falešně reaktivní výsledky. Podíl reaktivních vzorků závisí na citlivosti a specifitě soupravy a na převaze protilátek HIV1 a HIV-2 v populaci.

Protilátky proti HIV se mohou díky dobrovolné participaci vyskytnout ve studii vakcinací proti HIV.

Interpretace tohoto diagnostického testu závisí na typu vakciny, která byla podána. Korelace s lékařskou historií a následné testování může být nezbytné pro přesnou diagnostiku HIV u dobrovolníků pro očkování.

### LITERATURA

- Alizon, M., Sonigo, P., Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.-C., Tiollais, P., Montagnier, L. and Wain-Hobson, S., 1984. Molecular Cloning of Lymphadenopathy-Associated Virus. *Nature* 312: 757-760.
- Hahn, B.N., Shaw, G.M., Arya, S.K., Popovic, M., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F., 1984. Molecular Cloning and Characterization of the HTLV-III Virus Associated with AIDS. *Nature* 312: 166-169.
- Luciw, P.A., Potter, S.J., Steimer, K., Dina, D. and Levy, J.A., 1984. Molecular Cloning of AIDS-Associated Retrovirus. *Nature* 312: 760-763.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C., 1984. Detection, Isolation, and Continuous Production of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
- Sarngadharan, M.G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. and Gallo, R.C., 1984. Antibodies Reactive with Human T-Lymphotropic Retroviruses (HTLV-III) in the Serum of Patients with AIDS. *Science* 224: 506-508.
- Vézinet-Brun, F., Barré-Sinoussi, F., Saimot, A.G., Christol, D., Montagnier, L., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Rozenbaum, W., Gluckmann, J.C. and Chermann, J.-C., 1984. Detection of IgG Antibodies to Lymphadenopathy-Associated Virus in Patients with AIDS or Lymphadenopathy Syndrome. *Lancet*: 1253-1256, June 9.
- Spire, B., Montagnier, L., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C., 1984. Inactivation of Lymphadenopathy Associated Virus by Chemical Disinfectants. *Lancet*: 899-901, Oct. 20.
- Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R. and Melnick, J.L., 1981. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *App. and Envir. Microbiol.* 42: 762-767.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbrum, W. et Montagnier, L., 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P. and Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
- Gold, J., Dwyer, J. 1994. A short history of AIDS. *Med. J. Aust.* 160:251-252.
- Saville R. D., Constantine N. T., Cleghorn F. R. and Al. Fourth-Generation Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the simultaneous Detection of Human Immunodeficiency Virus Antigen and Antibody. *J. of Clin Microbiology*, July 2001, p.2518-

Dok.:	INS IVCOMB.CE/CZ	Strana	10 z 11	Rev.: 0	Datum: 01/2008
-------	------------------	--------	------------	---------	----------------

2524.

14. Bernard Weber, El Hadij Mbarigane Fall, Annemarie Berger, Hans Wilhelm Doerr. Reduction of diagnostic Window by New

Fourth-Generation Human Immunodeficiency Virus Screening

Assays. J. of Clin. Microb. Aug. 1998, p. 2235-2239.

15. Clark J., Coates T. J., Lescano A. G., et Al. Different Positive

Predictive Values of commercially available Human Immunodeficiency Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. Clin. And Vacc. Immunology. Feb 2006 p.302-303.

16. Novack L., Galai N., Yaari A., Orgel M., Shinar E., Sarov B. Use

of Seroconversion Panels to estimate Delay in the detection of

Anti-Human Immunodeficiency Virus Antibodies by Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay of pooled Compared to Singleton

Serum Samples. J. of Clin Microbiol. Aug. 2006 p.2909-2913.

17. Apetrei C, Buzdugan I, Mitroi I, Duca M. The clinical and

immunological correlations between the p24 antigenemia levels and those of anti-p24 antibodies in HIV-seropositive children. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 1995 Apr-Jun;40(2):141-4. Romanian.

18. Shumai EP, Vorob'ev SM, Makarova NE, Tugizov ShM,

Zverev VV, Kushch AA. The immunoenzyme detection of the

HIV-1 antigen by using monoclonal antibodies to protein p24. Vopr Virusol. 1992 Sep-Dec;37(5-6):229-32. Russian.

19. d'Arminio Monforte A, Novati R, Marchisio P, Zanchetta N,

Uberti-Foppa C, Tornaghi R, Massironi E, Lazzarin A, Principi

N. Early diagnosis of HIV infection in infants. AIDS. 1989 Jun;3(6):391-5.

20. Borghi V, De Rienzo B, Pietrosevoli P, Pecorari M, Mongiardo N, Pellegrino F, Zanchetta GP, Lami G, Squadrini

F. Detection of serum HIV-Ag related to the major core protein

(p24) in persons at risk for AIDS.

Microbiologica. 1989 Jan;12(1):81-3.

21. Goudsmit J, Lange JM, Krone WJ, Teunissen MB, Epstein

LG, Danner SA, van den Berg H, Breederveld C, Smit L, Bakker M, et al. Pathogenesis of HIV and its implications for

serodiagnosis and monitoring of antiviral therapy. J Virol Methods. 1987 Aug;17(1-2):19-34.

22. Lyamuya E, Bredberg-Raden U, Massawe A, Urassa E, Kawo

G, Msemu G, Kazimoto T, Ostborn A, Karlsson K, Mhalu F,

Biberfeld G. Performance of a modified HIV-1 p24 antigen assay for early diagnosis of HIV-1 infection in infants and

prediction of mother-to-infant transmission of HIV-1 in Dar

es Salaam, Tanzania. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Aug 1;12(4):421-6.

23. Clavel, F., Mansinho, K., Chamaret, S. et al. 1987. Human

immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in

West Africa. N. Engl. J. Med. 316:1180-1185.

24. Sinicco, A., Fora, R., Sciandra, M., Lucchini, A., Caramello, P.

and Gioannini, P. 1993. Risk of developing AIDS after primary

acute HIV-1 infection. J. of Acquired Immune Deficiency

Syndromes 6:575-581.

25. Ju Lin, Hsiang. 1995. Laboratory tests for human immunodeficiency viruses. J. Intl. Fed. Clin. Chem. 7(2):61-66.

26. IVD Directive 98/79/CE, Common Technical Specifications

(CTS) – Annex II, List A.

Tento výrobek byl vyroben firmou Dia. Pro s.r.l. pod kontrolou environmentálního systému zajišťujícího nejvyšší kvalitu a splňujícího požadavky ISO 13485, jak je uvedeno EC úředně oprávněným orgánem č. 0318
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Vyrábí:

Dia.Pro. Diagnostic Bioprobes

Srl. via Columella n°31 – Milano - Itálie

Dok.:	INS IVAB.CE/eng	Rev.: 0	1/2005
-------	-----------------	---------	--------

**Distributor:**

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 532/78b, 612 00 Brno

Tel: 541 243 113, fax: 541 243 114

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

