

HBsAg Confirmatory Test

HBsAg patvirtinantis tyrimas

REF 11820648 122

Lietuvių

Paskirtis

Imunologinis in vitro tyrimas, skirtas hepatito B paviršinio antigeno buvimo patvirtinimui pakartotinai reaktyviuose žmogaus serumo ir plazmos mėginiuose, tirtuose Elecsys HBsAg II tyrimu.

Santrauka

Nuorodos^{1,2,3,4,5,6,7,8}

Elecsys HBsAg Confirmatory Test yra pagrįstas specifinių antikūnų neutralizavimo principu. Polikloniniai HBsAg specifiniai antikūnai prisijungia prie hepatito B paviršinio antigeno imunodominantinių epitopų ir tokiu būdu blokuoja Elecsys HBsAg II tyrimo naudojamų antikūnų prisijungimo vietas.

Tyrimo principas

Tyrimo principas pagrįstas mėginių paruošimu naudojant patvirtinantį reagentą ir kontrolinį reagentą bei vėliau atliekant analizės procedūrą su Elecsys HBsAg II tyrimu. Teigiamos kontrolinės medžiagos tyrimas, PreciControl HBsAg II 2, turi būti atliekamas lygiagrečiai tyrimo atlikimo charakteristikų patikrinimui.

Mėginių paruošimas:

- Atlikus Elecsys HBsAg II tyrimą gauti pakartotinai reaktyvūs mėginiai yra lygiagrečiai apdorojami su patvirtinančiu reagentu ir kontroliniu reagentu, o vėliau inkubuojami. Patvirtinančio reagento anti-HBs antikūnų perteklius neutralizuoja visus mėginyje esančius HBsAg. Dėl to, vėliau atliekant Elecsys HBsAg II tyrimą, sumažėja ribinės reikšmės indekso (cutoff index, COI) vertė (mėginio signalas/ribinė reikšmė), lyginant su verte, kuri buvo gauta pradžioje tiriant mėginį.

Elecsys HBsAg II tyrimas:

- 1-oji inkubacija: Du paruošti mėginio preparatai reaguoja su biotinilintais monokloniniais HBsAg specifiniais antikūnais ir mono-/polikloniniais HBsAg specifiniais antikūnais, žymėtais rutenio kompleksu^{a)}, sudarydami sluoksninės struktūros kompleksą.
- 2-oji inkubacija: Pridėjus streptavidiną dengtų mikrodalelių, sąveikaujant biotinui ir streptavidinui, kompleksas prisijungia prie kietosios fazės.
- Reakcijos mišinys įsiurbiamas į matavimo kamerą, kurioje ant elektrodo paviršiaus magnetiniu būdu surenkamos mikrodalelės. Nesurištos medžiagos pašalinamos naudojant ProCell/ProCell M. Prie elektrodo prijungus elektros srovę skatinama chemoluminescencinė emisija, kurios dydis išmatuojamas fotodaugintuvu.
- Rezultatai programoje nustatomi automatiškai, palyginant elektrocheminės luminescencijos signalą, gautą iš mėginio reakcijos produkto, su anksčiau kalibravimo metu gautu ribinės (cutoff) reikšmės signalu. Po to rankiniu būdu verifikuojamas tyrimo patikimumas ir interpretuojami rezultatai.

a) Tris(2,2'-bipiridil) rutenio(II) kompleksas (Ru(bpy)₃²⁺)

Reagentai - darbiniai tirpalai

HBsAg Confirmatory Test 1

Patvirtinantis reagentas (juodas dangtelis), 2 buteliukai, kiekviename iš jų po 1.0 mL:

Anti-HBs (žmogaus) > 200000 IU/L žmogaus serume; konservantas.

HBsAg Confirmatory Test 2

Kontrolinis reagentas (baltas dangtelis), 2 buteliukai, kiekviename iš jų po 1.0 mL:

Žmogaus serumas, anti-HBs < 3 IU/L; konservantas.

Atsargumo priemonės ir įspėjimai

Skirta naudoti in vitro diagnostikai.

Laikykites įprastų atsargumo priemonių, būtinų dirbant su visais laboratorijos reagentais.

Visos atliekos turi būti tvarkomos laikantis vietos reikalavimų.

Saugos duomenų lapas pateikiamas profesionaliems naudotojams paprašius.

Visa iš žmogaus gauta medžiaga turi būti laikoma potencialiai užkrečiama. Visi iš žmogaus kraujo kilę produktai yra pagaminti išimtinai iš individualiai ištirtų donorų kraujo, kuriame nebuvo aptikta HBsAg ir antikūnų prieš HCV bei ŽIV. Taikyti tyrimo metodai yra patvirtinti FDA arba jų atitiktis patvirtinta pagal Europos Direktyvos 98/79/EB II priedą A sąrašą.

Tačiau, kadangi jokių tyrimo metodu negalima visiškai atmesti potencialios infekcijos rizikos, su medžiaga reikia elgtis taip pat atsargiai, kaip ir su

pacientų mėginiais. Kontakto su medžiaga atveju laikykites atsakingų sveikatos tarnybų nurodymų.^{9,10}

Dirbdami su visų rūšių reagentais ir mėginiais (mėginiais, kalibratoriais ir kontrolinėmis medžiagomis) venkite putų susidarymo.

Reagentų paruošimas

Rinkinio reagentai yra paruošti naudojimui. Vengti užteršimo. Po naudojimo laikykite 2-8 °C temperatūroje.

Laikymo sąlygos ir stabilumas

Laikyti 2-8 °C temperatūroje.

Stabilumas:	
neatidarius, 2-8 °C temperatūroje	iki nurodytos galiojimo datos
atidarius, 2-8 °C temperatūroje	8 savaitės

Mėginių surinkimas ir paruošimas

Mėginiai, kurie buvo pakartotinai reaktyvūs Elecsys HBsAg II tyrimu.

Dėl stabilumo ir mėginių surinkimo čia taip pat taikomos sąlygos, kurios buvo aprašytos Elecsys HBsAg II tyrimuose.

Pateiktos medžiagos

Apie reagentus skaitykite skyriuje „Reagentai - darbiniai tirpalai“.

Reikalingos (bet nepateikiamos) medžiagos

- REF 04687787, HBsAg II reagentų rinkinys, skirtas 100 tyrimų (medžiagos, kurių reikia atliekant Elecsys HBsAg II tyrimą, yra išvardintos Elecsys HBsAg II pakuotės lapelyje)
- REF 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL mėginių skiediklis arba REF 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL mėginių skiediklis
- Elecsys 2010, MODULAR ANALYTICS E170 arba cobas e analizatorius

Tyrimas

Mėginių paruošimas:

Reakcijos tūrių pasirinkimas priklauso nuo mėginių, kurie reagavo Elecsys HBsAg II tyrimu, atitinkamo ribinės reikšmės (cutoff) indekso dydžio. Šie tūriai pipete perkeliama į Elecsys mėginių indelius:

- Su teigiamais mėginiais, kurių ribinės reikšmės indeksas < 7.0
270 µL mėginio + 30 µL patvirtinančio reagento
270 µL mėginio + 30 µL kontrolinio reagento
arba
- Su teigiamais mėginiais, kurių ribinės reikšmės indeksas yra nuo 7.0 iki < 30
150 µL mėginio + 150 µL patvirtinančio reagento
150 µL mėginio + 150 µL kontrolinio reagento
arba

- Su teigiamais mėginiais, kurių ribinės reikšmės indeksas ≥ 30
Iš anksto atskieskite mėginius su Diluent Universal santykiu 1:20
150 µL atskiesto mėginio + 150 µL patvirtinančio reagento
150 µL atskiesto mėginio + 150 µL kontrolinio reagento

PreciControl HBsAg II 2, teigiama kontrolė, turi būti atliekama lygiagrečiai, kaip veikimo patikrinimas:

270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL patvirtinamojo reagento

270 µL PreciControl HBsAg II 2 + 30 µL kontrolinio reagento

Reaguojančių medžiagų inkubacija: 30-60 minučių 15-25 °C temperatūroje arba per naktį 2-8 °C temperatūroje.

Elecsys HBsAg II tyrimas:

Paruošti mėginiai yra dedami į mėginių zoną ir registruojami įvedant mėginių identifikacijos duomenis.

Elecsys HBsAg II tyrimas yra atliekamas pagal tyrimo reagentų rinkinio pakuotės lapelyje pateiktas instrukcijas.

HBsAg Confirmatory Test

HBsAg patvirtinantis tyrimas

cobas®

Kalibravimas

Kalibravimo, kalibravimo dažnio ir kalibravimo patikimumo patvirtinimo duomenis žr. Elecsys HBsAg II tyrimo pakuotės lapelyje.

Kokybės kontrolė

PreciControl HBsAg II 2 visada turi būti atliekami lygiagrečiai su tais mėginiais, kuriems reikia patvirtinimo. Patikimumo patvirtinimą atlieka vartotojas.

Elecsys HBsAg II tyrimui taikomos sąlygos, nurodytos pakuotės lapelyje.

Skaiciavimas

Analizatorius automatiškai apskaičiuoja ribinę reikšmę (cutoff), remdamasis dviejų rinkinyje esančių Elecsys HBsAg II kalibratorių matavimais.

Mėginio rezultatas pateikiamas kaip reaktyvus arba nereaktyvus, o taip pat ribinės reikšmės indekso (cutoff index, COI) = (signal sample/cutoff) forma.

Ribinės reikšmės indeksas reikalingas pasirenkant tinkamus mėginio paruošimo būdus patvirtinamajam tyrimui.

Apribojimai - poveikiai

Dėl didelės dozės kablo efekto pasireiškimo, su mėginiais, kuriuose HBsAg koncentracija yra labai didelė ($> 1 \text{ mg/mL}$ arba $> 550000 \text{ IU/mL}$), Elecsys HBsAg II tyrime gali būti gaunamas ribinės reikšmės indeksas < 30 . Tokie mėginiai nėra tinkamai neutralizuojami veikiant nurodytam patvirtinamojo reagento kiekiui ir todėl nėra patvirtinami, kaip teigiami. Šiuos mėginius galima atpažinti iš to, kad COI atliekant tyrimą su kontroliniu reagentu bus didesnis už originalaus HBsAg tyrimo mėginių COI (atskiedimo poveikis). Šių mėginių patvirtinimo tyrimą reikia kartoti su didesniu atskiedimu (ne mažesniu kaip 1:100).

Elecsys HBsAg II tyrimo duomenys pateikti tyrimo reagentų pakuotės lapelyje, skyriuje „Apribojimai - poveikiai“.

Diagnozuojant, rezultatai visada turėtų būti vertinami kartu su paciento anamneze, fizinio ištyrimo duomenimis ir kitais radiniais.

Rezultatų vertinimas ir interpretavimas

Tyrimo patikimumo verifikavimas

Prieš vertinimą reikia verifikuoti tyrimo patikimumą. Vertinimas gali būti atliekamas, kai greta Elecsys HBsAg II tyrimui keliamų sąlygų yra laikomasi ir šių kriterijų:

- PreciControl HBsAg II 2 tyrimo, kuris atliekamas su patvirtinamuoju reagentu, ribinės reikšmės indeksas turi būti $\leq 60 \%$ tyrimo, kuris atliekamas su kontroliniu reagentu:
tyrimo, atliekamo su kontroliniu reagentu, $\text{COI} \triangleq 100 \%$
tyrimo, atliekamo su patvirtinamuoju reagentu, $\text{COI} \triangleq x \%$
Jei $x > 60 \%$, reikia patikrinti tyrimo sąlygas. Kai tinkama, pakartokite tyrimą su šviežiu reagentu.
- Kad mėginio vertinimas būtų patikimas, mėginio su kontroliniu reagentu ribinės reikšmės indeksas turi būti ≥ 0.81 .
Ribinės reikšmės indeksas < 0.81 rodo, kad atskiedimas yra per didelis. Tokius mėginius reikia iširti pakartotinai, neatskiestus arba mažiau atskiestus.

Rezultatų vertinimas ir interpretavimas

- Kad būtų patvirtintas teigiamas rezultatas, mėginio ribinės reikšmės indeksas su patvirtinamuoju reagentu turi būti $\leq 60 \%$ indekso, gauto su kontroliniu reagentu, kurio ribinės reikšmės indeksas turi būti ≥ 0.81 .

Vertinimas:

tyrimo, atliekamo su kontroliniu reagentu, $\text{COI} \triangleq 100 \%$

tyrimo, atliekamo su patvirtinamuoju reagentu, $\text{COI} \triangleq x \%$

Interpretacija:

$x > 60 \%$ ir kontrolinio reagento $\text{COI} \geq 0.81$ = nereaktyvus

$x > 60 \%$ ir kontrolinio reagento $\text{COI} < 0.81$ = negaliojantis

$x \leq 60 \%$ ir kontrolinio reagento $\text{COI} \geq 0.81$ = teigiamas

$x \leq 60 \%$ ir kontrolinio reagento $\text{COI} < 0.81$ = neaiškus

Negaliojančius rezultatus reikia patikrinti pakartotinai su šviežiu reagentu.

Jei rezultatas išlieka negaliojantis, reikia iširti kitą mėginį. Neaiškius rezultatus reikia patikrinti pakartotinai. Jei rezultatas lieka neaiškus, reikia iširti kitą mėginį. Jei manote, kad mėginyje pasireiškia didelės dozės kablo

efektas, apie didesnę paruošiamąjį tokių mėginių skiedimą žr. skyriuje „Apribojimai - poveikiai“.

Specifiniai tyrimo atlikimo duomenys

Reprezentaciniai tyrimo atlikimo duomenys rankiniu būdu atliekamam mėginių paruošimui prieš Elecsys HBsAg tyrimą Elecsys analizatoriuose yra pateikiami žemiau. Atskirose laboratorijose gauti rezultatai gali skirtis.

Glaudumas

Rankiniu būdu atliekamo tyrimo etapų tikslumas buvo nustatytas naudojant 3 skirtingų HBsAg koncentracijų serumus (su vienu mėginiu 8-10 kartų ir tiek su kontroliniais, tiek su patvirtinančiais reagentais). Po 30 minučių trukusio inkubacijos laikotarpio 20°C temperatūroje, paruošti mėginiai buvo tiriami Elecsys analizatoriuose su Elecsys reagentais, kalibratoriais ir kontrolinėmis medžiagomis.

Originalaus HBsAg tyrimo rezultatai - be mėginių paruošimo (atkartojamumas, $n = 8-10$):

Mėginys	Vidurkis COI	SD COI	CV %
ŽS ^{b)} , COI < 7.0	1.65	0.04	2.2
ŽS, COI $7.0 - < 30$	11.3	0.11	1.0
ŽS, COI ≥ 30	669	16.0	2.4

b) ŽS = žmogaus serumas

Rezultatai po rankinio mėginių paruošimo:

Mėginys	Kontrolinė reakcija			Patvirtinamoji reakcija			
	Vidurkis COI	SD COI	CV %	Vidurkis COI	%	SD COI	CV %
ŽS, COI < 7.0	1.57	0.03	2.1	0.42	27	0.04	9.1
ŽS, COI $7.0 - < 30$	4.85	0.10	2.1	0.40	8.2	0.02	3.8
ŽS, COI ≥ 30	1321	11.6	0.9	1.31	0.1	0.10	7.9

Nustatymo riba

Siekiant nustatyti jautrumą, HBsAg koncentracija, atitinkanti ribinės (cutoff) reikšmės matavimo signalą, buvo nustatyta iš serijinių HBsAg standartų praskiedimų HBV-neigiamame žmogaus serume standartinių kreivių.

Atskiedimai $\leq 0.1 \text{ U/mL}$ ir $\leq 0.1 \text{ IU/mL}$ buvo aiškiai patvirtinti su Paul-Ehrlich Instituto standartu (potipio pranešimas, 1987) ir NIBSC etalonu (kodo numeris: 00/588; PSO antrasis tarptautinis HBsAg, potipio adw2, genotipo A etalonas) naudojant Elecsys HBsAg Confirmatory Test.

Metodų palyginimas

Palyginus Elecsys HBsAg Confirmatory Test su rinkoje esančiu HBsAg patvirtinančiu tyrimu (MEIA) 90 pakartotinai reagavusių pacientų mėginių, gautas toks rezultatas:

HBsAg patvirtinantis tyrimas	Patvirtintas teigiamas rezultatas	Neigiamas	Sutapimas
Elecsys tyrimas	90	0	100 %
MEIA palyginamasis tyrimas	90	0	100 %

Klinikinės jautrumas

Atlikus Elecsys HBsAg Confirmatory Test, buvo galima patvirtinti 20 mėginių iš 20, 1-2 ribinės reikšmės indekso ribose.

Klinikinės specifiškumas

Elecsys HBsAg Confirmatory Test specifiškumas buvo tikrinamas naudojant patvirtintus teigiamus ir klaidingai teigiamus mėginius. 318 teigiamų mėginių rezultatų buvo patvirtinti kaip teigiami. Vieno klaidingai teigiamo kraujo donoro mėginio ir 19 dirbtinai paruoštų klaidingai teigiamų mėginių, kuriuose buvo poveikį darančių medžiagų, rezultatai buvo neigiami. Todėl Elecsys HBsAg Confirmatory Test specifiškumas abiejose grupėse yra 100 %.

Išplėstiniai specifiniai tyrimo atlikimo duomenys
Elecsys HBsAg ir HBsAg II tyrimų palyginimas

HBsAg Confirmatory Test

HBsAg patvirtinantis tyrimas

cobas®

HBsAg teigiamų mėginių grupėje $n = 88$ Korėjoje buvo įrodytas Elecsys HBsAg ir Elecsys HBsAg II tyrimų suliginamumas (1 mėginys buvo atmestas dėl neteisingo pradinio mėginio pasirinkimo; 1 mėginys buvo neigiamas abiejuose HBsAg tyrimuose (COI 0.81-0.88), bet iš pradžių buvo teigiamas (COI 1.12), kai buvo atlikti matavimai Korėjoje; 2 mėginių tyrimas nebuvo atliekamas su Elecsys HBsAg Confirmatory Test dėl nepakankamo mėginio tūrio). Mėginių matavimai pirmą kartą buvo atliekami Elecsys HBsAg ir Elecsys HBsAg II tyrime, naudojant Elecsys HBsAg Confirmatory Test reagentus ir pakartotinai atliekant matavimus abiejuose tyrimuose. Likusiuose 84-uose HBsAg teigiamuose mėginiuose Elecsys HBsAg ir Elecsys HBsAg II tyrimuose buvo stebėtas vienodas neutralizacijos poveikis (koreliacijos koeficientas 0.995).

Neutralizavimas mėginių, kuriuose yra HBsAg mutacijų

Elecsys HBsAg Confirmatory Test pritaikomumas mėginių, kuriuose yra mutacijų, neutralizavimui buvo vertinamas $n = 19$ natyviųjų mėginių (atskiestų ir neatskiestų) grupėje. Mėginių matavimai buvo atliekami su Elecsys HBsAg II tyrimu ir papildomai su 3 registruotais HBsAg tyrimais. 2 mėginiai (atitinkamai, mutacija M133L/M143T/G145R ir mutacija T45S/I49R/113T114/I186P), kurie reagavo neigiamai visuose tyrimuose, 1-oji mutacija tirta su 3 tyrimais (COI 0.03-0.76), 2-oji mutacija tirta su 4 tyrimais (COI 0.03-0.78). 5 mėginių ištyrimas naudojant Elecsys HBsAg Confirmatory Test nebuvo atliktas, nes mėginio tūris buvo per mažas (įskaitant abu mėginius, kurių rezultatas su visais tyrimais buvo neigiamas). Likusieji 14 natyviųjų mėginių, kuriuose buvo mutacijų, buvo efektyviai neutralizuoti naudojant Elecsys HBsAg Confirmatory Test (55.6-99.7 % neutralizacija).

Nuorodos

- Gerlich W. Viral Hepatitis. Section 2, Churchill Livingstone, Ed. Zuckermann AJ, Thomas HC, 1993:83-113.
- Hollinger FB. Hepatitis B virus. In: Fields BN, Knipe DM (eds). Virology ed. 2 New York Raven Press 1990;2:2171-2236.
- Couroucé-Pauty AM, Plancon A, Soulier JP. Distribution of HBsAg Subtypes in the World. Vox Sang 1983;44:197-211.
- Frösner G. Moderne Hepatitisdiagnostik. Frösner G Kilian Verlag, Marburg 1996.
- Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM. Serologic Diagnosis of Acute and Chronic Viral Hepatitis. Seminars in Liver Disease 1991;11/2:73-83.
- Frösner G, Schomerus H, Wiedmann KH, et al. Diagnostic significance of quantitative HBsAg determination in acute and chronic hepatitis B infection. Eur J Clin Microbiol 1982;1:52-58.
- CDC. Prevention of Perinatal Transmission of Hepatitis B Virus: Prenatal Screening of all Pregnant Women for Hepatitis-B-Surface Antigen: Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). MMWR 1988;37:341-355.
- STIKO Recommendations, Bundesgesundheitsblatt 1996;1/96:32-42.
- Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.

Išsamesnės informacijos ieškokite jus dominančio analizatoriaus naudotojo vadove, atitinkamuose pritaikymo aprašuose, produkto informacijoje ir visų reikiamų komponentų pakuočių informaciniuose lapeliuose (jeigu jie prieinami jūsų šalyje).

Šiuose informaciniuose lapeliuose kaip dešimtainės trupmenos skyriklis visada naudojamas taškas, skiriantis sveikąjį skaičių nuo dešimtainės trupmenos skaitmenų. Tūkstančių skyrikliai nenaudojami.

Simboliai

Roche Diagnostics papildomai naudoja šiuos simbolius ir ženklus, be išvardintų standarte ISO 15223-1.

CONTENT	Rinkinio turinys
SYSTEM	Analizatoriai/instrumentai, su kuriais gali būti naudojami reagentai
REAGENT	Reagentas
CALIBRATOR	Kalibratorius



GTIN

Tūris po atskiedimo arba maišymo

Visuotinis prekybos identifikacijos numeris (angl. Global Trade Item Number)

Reikšmingi papildymai ar pakeitimai yra pažymėti pakeitimų juosta parašėte.

© 2014, Roche Diagnostics

CE 0123



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

