

**VIROTECH Brucella IgG/IgM ELISA
(Brucella IgG/IgM ELISA)**

objednací číslo : EC101.00

Brucella IgA-Set

objednací číslo : EC101.08

barevné kódování : oranžová

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

tel.: +49-6142-6909-0

fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 8.4.2019

REV 23 / VIROTECH Brucella IgG/IgM/IgA ELISA CZ

Obsah

1. Účel použití.....	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy	3
3.1 IgG/IgM souprava.....	3
3.2 IgA souprava.....	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití.....	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál	4
7.2 Příprava reagensů	4
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....	5
7.4 Použití analyzátorů ELISA	5
8. Vyhodnocení testů	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	6
8.3 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA.....	6
8.4 Limity testu.....	6
9. Literatura	6
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....	7

1. Účel použití

Tento přípravek Brucella ELISA slouží ke kvalitativnímu a semikvantitativnímu prokázání protilátek IgG, IgM a IgA proti *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* a *Brucella suis* v lidském séru.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

3. Obsah soupravy

3.1 IgG/IgM souprava

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **šedící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgG negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgM negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
8. **IgM hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
9. **IgM pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
10. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha kšólová) s kšén-peroxidázou-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
11. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšólová) s kšénovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS řídí fetální telecí sérum)
12. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

3.2 IgA souprava

1. **IgA negativní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
2. **IgA hraniční kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
3. **IgA pozitivní kontrola, 1300µl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
4. **IgA- konjugát (anti-human), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšólová) s kšénovou peroxidázou s FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné, (FCS řídí fetální telecí sérum)

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Lidská ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce

mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v souladu s dodaným sálkem s vysoušecím sálkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nežedňový, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	žedňový	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po žedňování (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

- Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Pěsto by měly být všechny vzorky, žedňové vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
- Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
- Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

- Destilovaná/demineralizovaná voda
- Vícekanálová pipeta 50μl, 100μl
- Mikropipety: 10μl, 100μl, 1000μl
- Zkumavky
- Utěrky z buniťiny
- Víčka na destičky ELISA
- Odpadkové koše na infekční materiál
- Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
- Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
- Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního postupu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Žedňovní pacientů používejte vždy I. erstvá.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

- Používejte pouze I. erstvá, nikoli inaktivovaná séra.
- Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagensů

Diagnostic VIROTECH Diagnostics System nabízí vysokou stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k žedňování a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny barvy a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s příslušnými destičkami uvedenými v certifikátu kontroly kvality.

- Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
- Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna řádla temperována na pokojovou teplotu.
- Všechny tekuté reagensy před použitím dobře protřepte.

4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráту tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepjte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou narušit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpci prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá předcházení adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100μl zředěného pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG, IgM a IgA, a na zředěných séra pacienta. Doporučíme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění séra pacienta : 1+100; např. 10μl sérum + 1ml zředěného pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destilka se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí třikrát promývacím roztokem 350 - 400μl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100μl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje třikrát následné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100μl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50μl. Destilku opatrně a pečlivě protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně fialově zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o desetinu od absorbancí kontrol a vzorků. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přezkontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přezkontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za tři tvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testů

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG, IgA a IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkyvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Výpočetné VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{OD hranicí}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorku}}{\text{OD hranicí}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA

Výsledek (VE)	Posouzení
< 9,0	negativní
9,0 - 11,0	hraniční hodnoty
> 11,0	pozitivní

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovat testovat z nového odběru. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně tj. v jedné testovací válce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
- Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.

8.4 Limity testu

- Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, je-li jsou k dispozici.
- Je třeba dbát na potenciální křížové reakce při infekcích tularémie, Yersinia enterocolitica, salmonelových infekcích a cholery (to platí i pro ochranná očkování proti choleře). (1)

9. Literatura

- Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. (2001). Brucellose: Erkennung und Behandlung. Merkblatt für Ärzte
- Dickgießer, N. (1992) Gattung Brucella. S. 158-162. In: Burkhardt, F. Mikrobiologische Diagnostik. Thieme, Stuttgart
- Araj, GF. (1999) Human Brucellosis: A classical infectious disease with persistent diagnostic challenges. Clin. Lab. Science 12(4), 207-211

Připrava vzorků a promývacího roztoku

É **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

É **zředění vzorky IgG/IgA**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

É **zředění vzorky IgM**
1:101

**adsorpce revmatoidního faktoru pomocí
RF-SorboTech**

např.:

5 µl sérum/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +
1 kapka RF- SorboTech, inkubace při pokojové teplotě
po dobu 15 minut

Schéma testu

