

**VIROTECH Masern/Measles IgG ELISA
(Masern/Measles IgG ELISA)**

Obj. č.: EC105G00

Masern/Measles IgG Liquor/CSF Standards

Obj. č.: EC105L60

Masern/Measles IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Obj. č.: EN105L65

Farebné kódovanie: šedé

POUŽÍVAŤ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Obsah

1. Účel použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie	3
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia	4
6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)	4
7. Vykonanie testu.....	4
7.1 Vyšetrovaný materiál.....	4
7.2 Príprava reagensí.....	4
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	4
7.4 Použitie procesorov ELISA.....	5
8. Vyhodnotenie testu.....	5
8.1 Kontrola fungovania testu.....	5
8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schéma vyhodnotenia IgG	6
8.4 Hranice testu.....	6
9. Literatúra.....	6
10. Schéma priebehu testu	7

1. Účel použitia

ELISA osýpok je určená na stanovenie akútnej infekcie alebo nedávno prekonanej infekcie vírusom osýpok, resp. na detekciu očkovacích protilátok.

2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunitný komplex. Nenaviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení na žlté.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG

1. **1 mikrotitračná doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgG konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
8. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensii pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávajte pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

1. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
2. Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.
3. Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

Materiál	Stav	Skladovanie	Trvanlivosť
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitračná platnička	po otvorení	+2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom)	3 mesiace
RF-SorboTech	nezriedené, po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	Zriedený	+2 až +8 °C	1 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (TMB)	po otvorení	+2 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitračné prúžky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť tečúcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanálová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky
5. Rúšok z buničiny
6. Kryt platničiek ELISA
7. Odpadový kontajner pre infekčný materiál
8. Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitračných platní
9. Spektrofotometer pre mikrotitračné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
10. Inkubátor

7. Vykonalie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Vyšetrovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulancií tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy čerstvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné..

1. Používajte len čerstvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

7.2 Príprava reagensí

Diagnostický systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje použiť riediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a šarže. Kontrolné roztoky pripravené na použitie (pozitívne kontrolné séra s hodnotou odstrihnutia - cut-off, negatívne kontrolné séra) sa musia použiť podľa špecifických parametrov a výhradne s platňou, ktorej šarža je uvedená v certifikáte kontroly kvality.

10. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
11. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúžkami.
12. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
13. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštáliky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potraсте).

7.3 Vykonalie testu VIROTECH ELISA

1. Pre každú predprípravu testu napipetujte po 100 µl riediaceho pufru pripraveného na použitie (slepý pokus), negatívnych, cut-off a pozitívnych kontrolných roztokov IgG, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúčame vždy dvojitú sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá sada naliehavo potrebná. Pracovné nariadenie sér pacientov 1 + 100, napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru.
2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).

3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buničinový podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, až kým sa tekutiny celkom nepremiešajú a kým nie je vidieť jednotné žlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Pribehovú schému testu pozri na poslednej strane.

7.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používateľ je povinný prístroj pravidelne validovať.

VIROTECH Diagnostics odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. väčších opravách vášho procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúšanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrt' roka.
3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečuje bezchybnú funkciu vášho procesora ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Vyhodnotenie testu

Kontrolné roztoky pripravené na použitie slúžia k semikvantitatívnemu stanoveniu špecifických protilátok IgG, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýlky metódou výpočtu vyrovnávajú, čím sa dosiahne vysoká reprodukovateľnosť. Pri výpočte VE sa používajú priemerné hodnoty OD (optickej hustoty).

8.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť $< 0,15$.

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byť nižšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by mali byť vyššie, ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Vypočítané VE pozitívnych kontrol by sa mali nachádzať v rámci rozpätí, uvedených v certifikáte kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií.

$$\text{VE (pozit. kontr. roztok)} = \frac{\text{OD (pozitívny kontr. roztok)} - \text{OD (cut-off kontr. roztoku)}}{\text{OD (cut-off kontr. roztoku)}} \times 10$$

$$\text{VE (pacientovo sérum)} = \frac{\text{OD (pacientovo sérum)} - \text{OD (cut-off kontr. roztoku)}}{\text{OD (cut-off kontr. roztoku)}} \times 10$$

8.3 Schéma vyhodnotenia IgG

Výsledok (VE)	Posúdenie
< 9,0	negatívne
9,0 - 11,0	medzná hodnota
> 11,0	pozitívne

1. Ak sa namerané hodnoty VE vzorky nachádzajú nad hraničným rozsahom, považujú sa vzorky za pozitívne (dbať na manažment očkovania!).
2. Ak sa namerané hodnoty VE nachádzajú v rámci uvedeného medzného rozpätia, nezistila sa žiadna signifikantne vysoká koncentrácia protilátok, teda vzorky sa považujú za medzné. Pre spoľahlivý dôkaz infekcie je potrebné stanoviť obsah protilátok dvoch vzoriek séra. Jedna vzorka séra by sa mala otestovať priamo po vypuknutí infekcie, druhá vzorka o 5-10 dní neskôr (rekonvalescentné sérum). Koncentrácia protilátok oboch vzoriek sa musí určiť paralelne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť korektnú diagnózu.
3. Ak namerané hodnoty ležia pod definovaným medzným rozpätím, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné antigénovo-špecifické protilátky. Vzorky sa považujú za negatívne.
4. Druhý (NCBI kód 66/202) a tretí (NCBI kód 97/648) WHO štandard sú zahrnuté v dávkovom uvoľňovaní VIROTECH Masern / Measles IgG ELISA. Na základe vedeckých štúdií (3,6) sa dá predpokladať ochrana, ak má test VIROTECH Masern / Measles IgG ELISA pozitívny výsledok. Usmernenie S2K pre laboratórnu diagnostiku vírusových infekcií súvisiacich s tehotenstvom predpokladá, že ochranu možno predpokladať, ak je IgG proti osýpkam pozitívny a výsledok IgM je negatívny (5).

8.4 Hranice testu

Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brať zreteľ na klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.

9. Literatúra

1. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte – Masern. im Februar 2002 aktualisierte Fassung, Erstveröffentlichung 5.11.1999. http://www.rki.de/INFEKT/INFEKT.HTM?/INFEKT/INF_A-Z/RATMBL/RATMBL2.HTM&1
2. Gerike, Tischer, Santibanez, Einschätzung der Masernsituation in Deutschland, Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2000 – 43:11 – 21, Springer Verlag 2000, S. 17 Tabelle 2. <http://www.rki.de/GESUND/IMPFFEN/BGBL0100/00430011.PDF>
3. Gerike, Tischer, Santibanez, Einschätzung der Masernsituation in Deutschland, Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2000 – 43:11 – 21, Springer Verlag 2000, S. 14. <http://www.rki.de/GESUND/IMPFFEN/BGBL0100/00430011.PDF>
4. Evans, A.S., Kaslow, R.A., Viral Infections of Human, fourth edition, Plenum Medicals Book Company, 1997, 508-509.
5. S2K Leitlinie Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen (AWMF Registernummer 9993/001) (Stand: 31.03.2014 (in Überarbeitung), gültig bis 31.03.2019)
6. Chen R.T., Markowitz L. E., Albrecht P., Stewart J. A., Mofenson L. M., Preblud S. R., Orenstein W. A., Measles Antibody: Reevaluation of Protective Titers. JID 1990, 162.

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

▼ **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

▼ **Vzorky IgG -- zriedenie**

1:101

napr.

10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru
(riediaci pufer séra je pripravený na použitie)

Vykonanie testu

Inkubácia vzoriek

30 minút pri 37 °C

100 µl vzorky pacientov

Slepý pokus (riediaci pufer) a kontrolné roztoky

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobre vyklepať

Inkubácia konjugátu

30 minút pri 37 °C

100 µl konjugátu

IgG

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobre vyklepať

Inkubácia substrátu

30 minút pri 37 °C

100 µl substrátu

Zastaviť

50 µl zastavovacieho roztoku

opatrne potriať

Odmerať extinkciu

Fotometer pri 450/620 nm
(referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)