

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

objednací číslo : EC106.00

Mumps IgG Liquor/CSF Standards

objednací číslo : EC106L60

barevné kódování : světle zelená / průhledná

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 16.12.2019 07:27

REV 14 / VIROTECH Mumps IgG/IgM ELISA CZ

Obsah

1. Účel použití.....	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy IgG/IgM.....	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)	5
8.3 Schéma vyhodnocení IgG a IgM.....	6
8.4 Limity testu.....	6
9. Literatura	6
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....	7

1. Účel použití

Testovací kit na pušugnice ELISA IgG / IgM slouží k semikvantitativnímu a kvalitativnímu prokázání protilátek IgG a IgM proti viru pušugnic v lidském séru. Puštom se využívá prokázání protilátek IgM k diagnostice akutní infekce a prokázání protilátek IgG k určení stavu séra.

2. Princip testu

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

3. Obsah soupravy IgG/IgM

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**, (oví í nebo ostrucha kšvol' ará)-kšen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, pušpravený k použití
11. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (oví í nebo ostrucha kšvol' ará) s kšenovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS í fetální telecí sérum)
12. **Substrátový roztok tetrametylbenzidín (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensí pušpravených k použití

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

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající íást jednotlivých jamek/stripty v uzavřeném sál'ku se sušídlem puš teplotě 2 - 8°C. í inidla ihned po použití uskladněte opět puš 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, jeí je potřeba pro dané testování. V pušpadě íe jste odebrali pušíí velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpěť a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zšedíí	+2 až +8°C	max. 6h
	nezšedíí	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevšení	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevšení	+2 až +8° (skladování v souř'asné dodané sál'ku s vysoušecím sál'kem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezšedíí, po otevšení	+2 až +8°C	3 měsíce
	zšedíí	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevšení	+2 až +8°C (chráíe puš světlem)	3 měsíce
tetrametylbenzidín (TMB)	po otevšení	+2 až +8°C (chráíe puš světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevšení	+2 až +8°C	3 měsíce

prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. 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, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoru platí příslušné směrnice..
2. 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.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buniťiny
6. Víčka na destilky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destílek
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destilky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. 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 antikoagulantu), i když v tomto případě letáku je zmíněno pouze sérum.

Zředění pacientů používejte vždy i první.

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

1. Používejte pouze první, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagentů

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

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechny úhly a parametry na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (připadně tvorbu krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepte).
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** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá předběžná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100µl zkušňovacího pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG a IgM, a následných sér pacienta. Doporučujeme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zkušňový sér pacienta : 1+100; např 10µl sérum + 1ml zkušňovacího 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 1-2krát 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 1-2 násobné 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 odevteno 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 12 měsíců.
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

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

8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické hustoty

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

Hodnoty optické hustoty negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické hustoty 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.

$$\text{VE pozitivní kontrola} = \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{hraniční}} \times 10$$

$$\text{VE vzorek} = \frac{\text{OD vzorek}}{\text{hraniční}} \times 10$$

8.3 Schéma vyhodnocení IgG a IgM

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

1. Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
2. Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovaně 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.
3. 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

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
2. Séra s dvojitou anti-grubovicí DNS (α -dsDNS) (ANA, systemický Lupus erythematosus) vykazují křížovou reaktivitu vřítí i přípravku VIROTECH Diagnostics Mumps (přítomnost) ELISA.

9. Literatura

1. H. Hahn et al.; Medizinische Mikrobiologie; 3. Auflage 2001, S. 554-556
2. T. Porstmann; Diagnostische Bibliothek Nr. 19, 1994
3. F. Burkhardt et al.; Mikrobiologische Diagnostik; 1992, S. 362-363
4. H. Reploh et al.; Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie; 7. Auflage 1994, S. 838
5. <http://www.aerzte-zeitung.de/docs/2002/01/22/012a1301.asp>
6. [awmf Leitlinie Registernummer 0093/001: Labordiagnostik schwangerschaftsrelevanter Virusinfektionen S2k-Leitlinie](#)

Připrava vzorků a promývacího roztoku

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

é **zředění vzorky IgG**
1:101

é **zředění vzorky IgM**
1:101

adsorpce revmatoidního faktoru pomocí RF-SorboTech

např:

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

např:

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

Schéma testu

