

**VIROTECH Candida albicans IgG/IgM ELISA
(C. albicans IgG/IgM ELISA)**

Rendelési szám: EC111.00

C. albicans IgA-Set

Rendelési szám: EC111.08

Színkód: Sötétbarna

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

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

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



Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A készlet tartalma.....	3
3.1 IgG / IgM teszt készlet.....	3
3.2 IgA szett.....	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 Vizsgálati anyag.....	4
7.2 A reagensek előkészítése	4
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése.....	5
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	6
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése.....	6
8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása.....	6
8.3 IgG, IgM és IgA kiértékelési táblázat	6
8.4 Interpretációs séma.....	7
8.5 A teszt határai	7
9. Irodalom	7
10. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	8

1. Alkalmazás célja

A *Candida albicans* ELISA anti-*Candida albicans* IgG-, IgM- és IgA-antitestek humán szérumból történő szemikvantitatív és minőségi kimutatására szolgál. A teszt invazív illetve generalizált *Candida mycosis* klinikai gyanúja esetén alkalmazandó. A lakosság magas érintettsége miatt a *Candida albicans* ELISA IgG kifejezetten a friss fertőzések kimutatására van beállítva.

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A készlet tartalma

3.1 IgG / IgM teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (lío-filizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgG negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgG kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgG pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgM negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
8. **IgM kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
9. **IgM pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
10. **IgG-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
11. **IgM-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
12. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, felhasználásra kész
13. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

3.2 IgA szett

1. **IgA negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
2. **IgA kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
3. **IgA pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
4. **IgA-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerrel, Tris pufferben, felhasználásra kész

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reagenseket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.
3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószer tasakkal)	3 hónap
RF-SorboTech	Hígítatlan, felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Véghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Övintézkedések és biztonsági előírások

- Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
- A tartósítószer tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
- A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

- Desztillált / ioncserélt víz
- Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
- Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
- Vegyszerüvegek
- Papírkendők és itatóspapír
- Fedő az ELISA lemezekhez
- Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
- ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
- Spektrofotométer ELISA lemezekhez , hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
- Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

- Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.
- Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azért, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. A felhasználásra kész kontrollok (pozitív kontroll, kimutatási határérték (cut-off) kontroll, negatív kontroll) paraméterfüggők és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).
5. A specifikus IgM-antitestek kimutatását zavarhatja a túl magas IgG-titer illetve reumafaktorok jelenléte, hamis pozitív illetve negatív eredményekhez vezetve. A **szérumokat elő kell kezelni RF-SorboTech** (VIROTECH-adszorpciószer) készítménnyel. IgM kontrollok esetében az előabszorpció lépés kimarad.

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Pipetázzon ki tesztenként 100 l felhasználásra kész hígítópuffert (üres minta), negatív, határérték (cut-off) és pozitív IgG-, IgM- és IgA kontrollt, valamint a hígított betegszérumokat. Minden esetben (üres érték, kontrollok, betegszérumok) javasoljuk hogy két párhuzamos mérést végezzen; a határérték (cut-off) kontrollok esetében a két mérés elvégzése feltétlenül szükséges.

A betegszérumok munkahígítása:

Kimutatandó antitest:	Betegszérum:	RF-SorboTech	PBS hígítópuffer
IgG és IgA	5µl	-	500µl előhígítás (1:101)
	30 µl az 1:101 előhígításból	-	270µl végso hígítás (1:1010)
IgM	5µl	50µl	450µl előhígítás (1:101)
	Az inkubálás után: 30µl az 1:101 előhígításból	-	Inkubáljuk szobahőmérsékleten 15 percig 270µl végso hígítás (1:1010)

(IgM diagnosztika esetén kérjük, vegye figyelembe az RF-SorboTech előkezelést!)

2. A reagensek kipipetázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyja lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipetázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3.pont).
7. Pipetázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipetázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárás mód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A felhasználásra kész kontrollok a specifikus IgG-, IgA- és IgM-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitatív meghatározására szolgálnak. A teszt végrehajtása során előforduló ingadozásokat a számítási módszer kiegyenlíti, ezáltal nagyfokú reprodukálhatóságot érve el. A VE kiszámításához az OD-értékek átlagát kell használni.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

a) OD-értékek

Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.

A negatív kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek alatt, míg a pozitív kontrollok és a cut-off kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell lenniük.

b) VIROTECH egységek (VE)

A cut-off kontrollok VIROTECH egységekben (VE) megadott értéke 10 VE-ben van meghatározva. A pozitív kontrollok VE-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott értéktartományon belül kell lenniük.

Amennyiben a fenti feltételek (OD-értékek, VE értékek) nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása

A vak minta extinkcióját (450/620 nm) minden extinkcióból ki kell vonni.

$$VE_{\text{(pozitív kontrollok)}} = \frac{OD_{\text{(pozitív kontroll)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(betegszérum)}} = \frac{OD_{\text{(betegszérum)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

8.3 IgG, IgM és IgA kiértékelési táblázat

Eredmény (VE)	Kiértékelés
< 9,0	negatív
9,0 - 11,0	kétséges diagnózis
> 11,0	pozitív

1. Amennyiben a minta mért VE értéke a határérték felett van, a mintát pozitívnak kell tekinteni.
2. Ha a mért VE értékek a megadott határérték tartományba esnek, az antitestek koncentrációja nem számottevő és a mintát határértéken levőnek kell tekinteni. A fertőzés biztos kimutatásához két szérummintából szükséges az antitestet kimutatni. Egy szérummintát közvetlenül a fertőzés kezdete után, egyet pedig 5-10 nappal később (rekonvaleszcens szérum) kell tesztelni. Az antitest-koncentrációt párhuzamosan, egyetlen teszt mérés során kell meghatározni mindkét mintából. Egyetlen szérumminta eredményei alapján korrekt diagnózis nem állítható fel.
3. Ha a mért értékek a meghatározott határérték alá esnek, a mintából nem mutatható ki antigénspecifikus antitest. A mintát negatívnak kell tekinteni.
4. Pozitív IgG eredmény vagy egy régi vagy egy friss fertőzésre utal.
Pozitív IgM eredmény akut fertőzésre utal, míg egy pozitív IgA eredmény viszonylag akut újrafertőzésre, mivel az IgA antitestek hónapokon át fennmaradhatnak.
Negatív eredmény arra utal, hogy a beteg nem érte fertőzés a múltban, illetve, hogy a beteg nem fertőzött a vizsgálat időpontjában.

8.4 Interpretációs séma

IgG	IgA	IgM	Interpretáció
-	-	-	nincs invazív candidiasisra utaló jel
+/gw	-	-	Visszamaradt fertőzésre utaló jel
-	+	-	Akut fertőzésre utaló jel
-	-	+	
+	+	-	
+	-	+	
+	+	+	
-	+	+	

8.5 A teszt határai

1. A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
2. Keresztreakció különösen olyan szérumok esetében várható, melyek egyéb *Candida* fajokra, *Mycoplasma*-ra illetve *Penicillium marneffrei*-re nézve pozitívak.
3. A magas *Candida* érintettség miatt gyakran fordul elő magas antitestkoncentráció, különösen az IgG esetében. Izolált, magas IgG titer ezért önmagában nem utal invazív candidiasisra.

A – bizonyos körülmények között életveszélyes – candidiasis idejekorán történő felismerése és kezelhetősége érdekében veszélyeztetett betegeknél javasolt a szérum hetente történő tesztelése. Invazív candidiasis akut gyanúja esetén további szérumminták vizsgálata szükséges.

Számításba kell venni, hogy határérték alatti, szignifikáns titer eredmény, különösen immunszuppresszált betegek és gyermekek esetében, invazív fertőzésre utaló jel lehet. Ezért az ELISA eredmények interpretációját mindig további tesztteredmények (HAT, kultúra) és labordiagnosztikai paraméterek valamint a klinikai kórkép figyelembe vételével kell végezni. Egyetlen szérumminta eredményei alapján korrekt diagnózis nem állítható fel.

9. Irodalom

1. T. Steinmetz; Candidamykosen in der Intensivmedizin; Mykosen Nr. 1, 1996, Seite 1-20
2. J. Krämer; Entwicklung neuer serologischer Testverfahren zur Diagnostik der invasiven Candidose auf der Basis von Markerantigenen; 1991; Doktorarbeit
3. D. Milatovic et al.; Candida Infektionen – neue Aspekte der Pathogenese, Therapie und Prophylaxe; 2. Auflage 1996
4. E. Werle et al.; Nachweis von Anti-Candida-Antikörpern der Klassen IgM, IgG und IgA mittels Enzymimmunoassays in sequentiellen Serumproben hospitalisierter Patienten, Mycoses, 37 (Suppl 1), 71-78 (1994)

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

▼ **IlgG-/IgA- minták – hígítás**
1:1010

pl.:

5 µl szérum/plazma + 500 µl hígítópuffer (1:101)

30 µl az 1:101 előhígításból + 270 µl hígítópuffer

(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

▼ **IgM- minták – hígítás**
1:1010

Reumafaktor-abszorpció RF-SorboTech-hel

pl.:

5 µl szérum/plazma + 450 µl hígítópuffer +

1 csepp RF-SorboTech (körülbelül 50µl)

15 perc inkubáció szobahőmérsékleten

30 µl az 1:101 előhígításból + 270 µl hígítópuffer

A vizsgálat elvégzése

Mintainkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl betegszérum

Üres minta (hígítópuffer) és kontrollok



4x mosás



400 µl mosóoldat

jól kiütögetni

Konjugátum inkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl konjugátum

IgG, IgM, IgA



4x mosás



400 µl mosóoldat

jól kiütögetni

Szubsztrátinkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl szubsztrát



Leállítás



50 µl fixáló (stop) oldat

óvatosan kevertetni

Extinkció mérés

Fotométer 450/620 nm-en
(referenciahullám hossza 620-690nm)