

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

Obj. č.: EC111.00

C. albicans IgA-Set

Obj. č.: EC111.08

Farebné kódovanie: tmavohnedé

POUŽÍVAŤ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO

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

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Obsah

1. Účel použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG/IgM	3
3.2 Súprava na stanovenie IgA	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.....	5
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Použitie procesorov ELISA.....	6
8. Vyhodnotenie testu.....	6
8.1 Kontrola fungovania testu.....	6
8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA	6
8.4 Interpretačná schéma	7
8.5 Hranice testu.....	7
9. Literatúra.....	8
10. Schéma priebehu testu	9

1. Účel použitia

ELISA IgM/IgG/IgA *Candida albicans* je určená na semikvantitatívne a kvalitatívne stanovenie protilátok IgG, IgM a IgA proti baktérii *Candida albicans* v ľudskom sére. Test sa má použiť pri klinickom podozrení na prítomnosť invazívnej resp. generalizovanej kandidovej mykózy. Na základe vysokej miery zamorenia populácie je ELISA IgG *Candida albicans* špeciálne nastavená na rozpoznanie čerstvých infekcií.

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/IgM

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. **premyvaci roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgM negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
8. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
9. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
10. **IgG konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
11. **IgM konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teliacim sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, pripravený na použitie
12. **Tetrametylbendizín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
13. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

3.2 Súprava na stanovenie IgA

1. **IgA negatívny kontrolný roztok, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
2. **IgA kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
3. **IgA pozitívny kontrolný roztok, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
4. **IgA konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) konjugát chrenovej peroxidázy s FCS a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, pripravený na použitie

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

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

- 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.
- 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.
- 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

- 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 opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
- 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.
- Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

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

7. Vykonanie 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..

- 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.

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúžkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
4. 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).
5. Vysoké IgG titre alebo reumatické faktory môžu rušiť špecifický dôkaz protilátok IgM a viesť k nesprávne pozitívnym alebo negatívnym výsledkom. **Pre správne stanovenie IgM je preto nutné séra vopred ošetriť prípravkom RF SorboTech** (adsorpčný prostriedok firmy VIROTECH). Pri kontrolných sérach IgM táto predabsorpcia odpadá.

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, IgM a IgA, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúčame zakaždým dvojitú sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov); pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá sada naliehavo potrebná.

Pracovné nariadenie sér pacientov:

Dôkaz:	Sérum pacienta	RF–SorboTech	Riediaci pufer PBS
IgG a IgA	5 µl	-	500 µl predriedenie (1:101)
	30 µl roztoku predriedeného v pomere 1:101	-	270 µl konečné zriedenie (1:1010)
IgM	5 µl	50 µl	450 µl predriedenie (1:101)
	Po inkubácii: 30 µl roztoku predriedeného v pomere 1:101	-	Inkubujte pri teplote miestnosti po dobu 15 minút 270 µl konečné zriedenie (1:1010)

(U IgM diagnostiky pamätajte na predbežnú úpravu prípravkom RF–SorboTech)

2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premytím, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku na každú jamku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale posledné zvyšky tekutín odstráňte vyklopaním na buničinový podklad.
4. Do každej jamky 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. Do každej jamky napipetujte 100 µl konjugátu 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.

Priebehovú 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, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýlky metódou výpočtu vyrovnajú, 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 odpočítat' od všetkých extinkcií.

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

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

8.3 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA

Výsledok (VE)	Posúdenie
---------------	-----------

< 9,0	negatívne
9,0 - 11,0	medzná hodnota
> 11,0	pozitívne

1. Ak namerané VE vzorky ležia nad medznou oblasťou, tak sa tieto vzorky považujú za pozitívne.
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. Pozitívny výsledok stanovenia IgG vypovedá buď o infekcii, ktorú pacient prekonal pred dlhšou dobou, alebo o čerstvej infekcii.

Pozitívny výsledok IgM indikuje akútnu infekciu a pozitívny výsledok IgA indikuje relatívne akútnu reinfekciu, pretože IgA môže perzistovať celé mesiace.

Negatívny výsledok hovorí o tom, že pacient nebol, resp. nie je infikovaný.

8.4. Interpretáčnā schéma

IgG	IgA	IgM	Interpretácia
-	-	-	Žiaden odkaz na invazívnu kandidózu
+ / gw	-	-	Odkaz na prekonanú infekciu
-	+	-	Odkaz na akútnu infekciu
-	-	+	
+	+	-	
+	-	+	
+	+	+	
-	+	+	

8.5. Hranice testu

1. Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brať zreteľ na klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.
2. Krížové reaktivity možno očakávať najmä u sér, ktoré sú pozitívne pre iné druhy kandid, mykoplazmu resp. *Penicillium marneffei*.
3. V dôsledku vysokého zamorenia kandidou sa často vyskytujú vysoké koncentrácie protilátok, najmä IgG. Izolovane vysoké titry IgG preto ešte nepoukazujú na invazívnu kandidózu.

Pre včasné rozpoznanie kandidózy, ktorá by mohla za istých okolností ohroziť život pacienta, a pre jej liečbu sa u rizikových pacientov odporúča testovanie vzoriek séra s týždňovým odstupom. Pri akútnom podozrení na invazívnu kandidózu by sa mali testovať doplňujúce vzorky séra.

Je treba dbať na to, že signifikantné priebehy titra pod hraničnými hodnotami, najmä u imunosuprimovaných pacientov a detí môžu byť poukazom na invazívnu infekciu. Z tohto dôvodu by sa mala interpretácia výsledkov ELISA uskutočniť vždy spolu s doplňujúcimi testami (HAT, kultúra) ďalšími laboratórnymi diagnostickými parametrami a klinickým obrazom. Správna diagnóza na základe hodnotenia jedinej sérovej vzorky nie je možná..

9. Literatúra

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)

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

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

▼ **Vzorky IgG/IgA - Zriedenie**
1:1010

napr.:

5 µl séra/plazmy + 500 µl riediaceho pufru (1:101)
30 µl predriedenia 1:101 + 270 µl riediaceho pufru
(Riediaci pufer séra je pripravený na použitie)

▼ **Vzorky IgM – Zriedenie**
1:1010

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

napr.:

5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +
1 kvapka prípravku RF-SorboTech (circa 50µl)
Inkubovať pri teplote miestnosti 15 min
30 µl predriedenia 1:101 + 270 µl riediaceho pufru

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

dobré vyklepať

Inkubácia konjugátu

30 minút pri 37 °C

100 µl konjugátu

IgG, IgM, IgA

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré 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)