

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

Nr zamówienia: EC111.00

C. albicans IgA-Set

Nr zamówienia: EC111.08

Kod barwny: ciemny-brązowy

TYLKO DO DIAGNOSTYKI 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**



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw do oznaczania IgG / IgM	3
3.2 Zestaw IgA.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiał do badań	4
7.2 Przygotowanie odczynników	5
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA.....	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA.....	6
8. Ocena wyników badania	6
8.1 Kontrola badania.....	6
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Schemat oceny IgG, IgM i IgA.....	6
8.4 Schemat interpretacji	7
8.5 Ograniczenia testu	7
9. Literatura.....	7

1. Cel zastosowania

Test ELISA Candida albicans IgM/IgG/IgA służy do ilościowego i jakościowego oznaczenia przeciwciał klasy IgG, IgM i IgA przeciw Candida albicans w surowicy ludzkiej. Test ten należy stosować w przypadku klinicznego podejrzenia występowania inwazyjnej lub uogólnionej grzybicy wywołanej przez Candida. Z powodu wysokiego wskaźnika rozpowszechnienia u ludności test ELISA Candida albicans IgG jest nastawiony specjalnie na rozpoznanie świeżych zakażeń.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydazy) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw do oznaczania IgG / IgM

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgM kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgM kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgM kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgM (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
13. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanę kwasów

3.2 Zestaw IgA

1. **IgA kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
2. **IgA kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
3. **IgA kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
4. **koniugat IgA (anty-human), 11 ml**, koniugat znaczonej (owczej lub koza) peroksydazą chrzanową z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

- Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
- Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
- Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
RF-SorboTech	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzydyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcję	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

- Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
- Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
- Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

- woda destylowana/demin.
- pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
- mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
- próbówki
- chusty z masy celulozowej
- przykrywka płytek ELISA
- pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
- ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
- spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
- inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
5. Wysokie miana IgG lub czynniki reumatoidalne (RF) mogą zaburzyć specyficzne oznaczenie przeciwciał IgM oraz prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. **Surowice potraktować wstępnie RF-SorboTech** (absorbentem firmy VIROTECH). W kontrolach IgM nie ma wstępnej absorpcji.

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), negatywnej, cut-off i pozytywnej kontroli IgG, IgM i IgA oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójnie oznaczenie jest obowiązkowo konieczne.

Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów:

Oznaczenie:	Surowica pacjenta	RF-SorboTech	Bufor do rozcieńczania PBS
IgG i IgA	5µl	-	500µl rozcieńczenie wstępne (1:101)
	30µl rocieńczenia wstępnego w stosunku 1:101	-	270µl rozcieńczenie końcowe (1:1010)
IgM	5µl	50µl	450µl rozcieńczenie wstępne (1:101)
	Po inkubacji: 30µl rocieńczenia wstępnego w stosunku 1:101	-	Inkubować przez 15 minut w temperaturze pokojowej 270µl rozcieńczenie końcowe (1:1010)

(w celu diagnostyki IgM należy przestrzegać wstępnego traktowania za pomocą RF-SorboTech!)

2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołek.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołek dodać pipetami po 50µ roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.

10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, IgA i IgM, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągnięta jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{kontrola pozytywna})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{kontrola pozytywna})}}{\text{OD}_{(\text{kontrola cut - off})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{surowica pacjenta})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{surowica pacjenta})}}{\text{OD}_{(\text{kontrola cut - off})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schemat oceny IgG, IgM i IgA

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	szara strefa
> 11,0	pozytywne

1. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.

2. Jeżeli zmierzone jednostki VE znajdują się w podanym zakresie granicznym, nie występuje istotnie duże stężenie przeciwciał, próbki są traktowane jako wartości graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio po rozpoczęciu zakażenia, a druga próbka 5-10 dni później (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczone równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są niższe od zakresu granicznego, w próbce nie występują dające się zmierzyć specyficzne dla antygenów przeciwciała. Próbkę są traktowane jako negatywne.

8.4 Schemat interpretacji

IgG	IgA	IgM	Interpretacja
-	-	-	brak wskazań kandydozy inwazyjnej
+ / gw	-	-	wskazanie przebytego zakażenia
-	+	-	wskazanie ostrego zakażenia
-	-	+	
+	+	-	
+	-	+	
+	+	+	
-	+	+	

8.5 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Reaktywności krzyżowej można oczekiwać w szczególności w przypadku tych surowic, które są pozytywne na inne gatunki *Candida*, *Mycoplasma* lub *Penicillium marneffei*.
3. Z powodu dużego rozpowszechnienia *Candida* często spotykane są duże stężenia przeciwciał, w szczególności IgG. Dlatego odosobnione wysokie miana IgG nie przemawiają jeszcze za kandydozą inwazyjną. W celu możliwości wczesnego rozpoznania i leczenia kandydozy, która może ewentualnie zagrażać życiu, zalecane jest w przypadku pacjentów z grupy ryzyka badanie próbek surowicy w odstępie jednego tygodnia. W przypadku ostrego podejrzenia kandydozy inwazyjnej należy przebadać dodatkowe próbki surowicy. Należy zwrócić uwagę, że znaczące zmiany miana poniżej wartości granicznych, w szczególności w przypadku pacjentów o obniżonej reakcji odpornościowej i dzieci, mogą wskazywać na zakażenie inwazyjne. Z tego powodu interpretacja wyników testu ELISA powinna następować zawsze w powiązaniu z dodatkowymi procedurami testowymi (HAT, hodowla), dalszymi parametrami diagnostyki laboratoryjnej oraz obrazem klinicznym. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.

9. Literatura

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)

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

▼ **Rozcieńczenie próbki IgG/IgA w stosunku 1:1010**

np.:

5 µl surowicy/osocza + 500 µl buforu do rozcieńczania
(1:101)

30 µl rozcieńczenia wstępnego w stosunku 1:101 + 270 µl
buforu do rozcieńczania

(Bufor do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

▼ **Rozcieńczenie próbki IgM w stosunku 1:1010**

**Absorpcja czynnika reumatoidalnego za
pomocą RF-SorboTech**

np.:

5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +
1 kroplę RF SorboTech (ok. 50 µl) inkubować przez 15 min
w temp. pok

30 µl rozcieńczenia wstępnego w stosunku 1:101 + 270 µl
buforu do rozcieńczania.

Wykonanie badania

Inkubacja próbek



4x płukanie



Inkubacja
koniugatu



4x płukanie



Inkubacja substratu



Zatrzymanie



Pomiar ekstynkcji

30 minut w temperaturze
37°C.

30 minut w temperaturze
37°C.

30 minut w temperaturze
37°C.

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i
kontrola

400 µl roztworu do płukania
dobrze wytrząsnąć

100 µl koniugatu
IgG, IgM, IgA

400 µl roztworu do płukania
dobrze wytrząsnąć

100 µl substratu

**50 µl roztworu do
zatrzymania reakcji**
ostrożnie wstrząsnąć

Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-
690nm)