

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

Obj. č.:EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

Obj. č.:EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

Obj. č.:EC116A00

Farebné kódovanie: IgG: hnedé/tmavomodré
IgM: testovací prúžok hnedý
IgM: referenčný prúžok hnedý/priezračný
IgA: bezfarebné

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
3.2 Testovacia súprava IgA.....	3
3.3 Testovacia súprava IgM	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie	4
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia	4
6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)	4
7. Vykonanie testu.....	5
7.1 Vyšetrovaný materiál.....	5
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 (IgG a IgA)	6
8.2 Kontrola fungovania testu (IgM)	6
8.3 Výpočet VIROTECHových jednotiek (VE) (IgG a IgA)	7
8.4 Výpočet VIROTECHových jednotiek (VE) (IgM)	7
8.5 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA	7
8.6 Hranice testu.....	8
9. Literatúra.....	8
10. Schéma priebehu testu	9

1. Účel použitia

ELISA enterovírus slúži na stanovenie skupinovo špecifických protilátok IgG, IgA a IgM proti enterovírusom v humánnom sére.

2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v humánnom sére (IgG, IgA) tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunokomplex. 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.

Protilátka (IgM) hľadaná v humánnom sére reaguje rovnako, ako je to popísané u IgA a IgG. K mikrotitračnej doske (testovaciemu prúžku) potiahnutej vrstvou antigénu sa navyše realizuje aj druhá mikrotitračná doska (referenčný prúžok). Rozdiel farebnej intenzity medzi testovacími prúžkom a referenčným prúžkom je mierou množstva naviazaných protilátok.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG

1. **1 mikrotitračná doska**, pozostávajúca z 96 antigénom potiahnutých jednotlivodlomiteľných jamôk, lyofilizovaná.
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 (20 x koncentrovaný)**, 50 ml, pH 7,2 s konzervačným prostriedkom a Tween 20.
4. **IgG negatívne kontrolné sérum**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
5. **IgG kontrolné sérum cut-off**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **Konjugát IgG (anithumánny)**, 11 ml, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v Tris-pufri, pripravený na použitie
8. **Roztok substrátu tetrametylbendidínu (3,3',5,5'TMB)**, 11 ml, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu**, 6 ml, obsahuje zmes kyselín

3.2 Testovacia súprava IgA

1. **1 mikrotitračná doska**, pozostávajúca z 96 antigénom potiahnutých jednotlivodlomiteľných jamôk, lyofilizovaná.
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 (20 x koncentrovaný), 50 ml, pH 7,2 s konzervačným prostriedkom a Tween 20.
4. **IgA negatívne kontrolné sérum**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
5. **IgA kontrolné sérum cut-off**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgA pozitívne kontrolné sérum**, 2000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgA konjugát (anithumánny)**, 11 ml, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym telacím sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris-pufri, pripravený na použitie
8. Tetrametylbendidín - roztok substrátu (3,3',5,5'TMB), 11 ml, pripravený na použitie
9. Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml, obsahuje zmes kyselín

3.3 Testovacia súprava IgM

Krabica 1

1. **1 mikrotitračná doska (testovací prúžok)**, pozostávajúca z 96 jednotlivodlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom
2. Riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie), 3 x 50 ml, pH 7,2 s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
3. Tetrametylbendidín – roztok substrátu (3,3',5,5'TMB), 11 ml, pripravený na použitie

Krabica 2

1. **1 mikrotitračná doska (referenčný prúžok)**, pozostávajúca z 96 jednotlivo odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom
2. Premývací roztok PBS (20 x koncentrovaný), 50 ml, pH 7,2 s konzervačným prostriedkom a Tween 20.
3. **IgM negatívne kontrolné sérum, 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
4. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
5. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgM konjugát (antihumánny), 2 x 11 ml**, (ovčí alebo kozí) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym telacím sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris pufri, pripravený na použitie
7. Zastavovací roztok citrónanu, 2 x 6 ml, obsahuje zmes kyselín

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.

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 absorbent	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 opatrnosťou. 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. 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..

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

Diagnostickej 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 koncentrácii 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 predadsorpcia odpadá.

7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

Všetky vzorky určené k testovaniu sa otestujú v **IgM**, ako aj na **testovacích prúžkoch** (prúžky s antigénom enterovírusu) ako aj na **referenčných prúžkoch** (prúžky s kontrolným antigénom). Preto sa pred otestovaním príslušný počet testovacích prúžkov a referenčných prúžkov, zodpovedajúci počtu vzoriek, zastrčí vedľa seba do držáka. **Prítom sa smú navzájom kombinovať len testovacie prúžky s rovnakým číslom šarže, ktoré je uvedené v osvedčení kontroly kvality.**

Testovania na IgA alebo IgG sa vykonávajú len na jednej mikrotitračnej doske.

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 vždy dvojtitú sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojtitá 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 vyklapaním 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 sú určené na semikvantitatívne stanovenie špecifických protilátok IgG, IgM a IgA, ktorých koncentrácia sa uvádza vo VIROTECHových jednotkách VE (=VIROTECH Einheiten). 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 (IgG a IgA)

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 Kontrola fungovania testu (IgM)

1. Od všetkých extinkcií pozitívnych, cut-off a negatívnych kontrolných sér, ako aj sér pacientov na testovacích prúžkoch sa odpočíta nameraná hodnota slepého pokusu (= „**Testovacie hodnoty**“).
2. Od všetkých extinkcií pozitívnych, cut-off a negatívnych kontrolných roztokov, ako aj sér pacientov na referenčných prúžkoch sa odpočíta nameraná hodnota slepého pokusu (= „**Referenčné hodnoty**“).
3. Pre všetky pozitívne, cut-off a negatívne kontrolné séra, ako aj séra pacientov sa vypočítajú „**rozdiele medzi výslednými hodnotami testu a referenčnými hodnotami**“ tak, že sa od jednotlivých výsledných hodnôt testu odpočítajú príslušné referenčné hodnoty.

a. Hodnoty OD

Rozdiel medzi výslednou hodnotou testu a referenčnou hodnotou negatívnych kontrolných roztokov by sa mal nachádzať pod hodnotami OD, ktoré sú uvedené v osvedčení kontroly kvality, rozdiel medzi výslednou hodnotou testu a referenčnou hodnotou pozitívnych kontrolných roztokov, ako aj roztokov s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by sa mal nachádzať nad hodnotami OD, ktoré sú uvedené v osvedčení kontroly kvality.

b, VIROTECHové jednotky (VE)

VIROTECHové jednotky (VE) kontrolných roztokov s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Vypočítané VE pozitívnych kontrolných roztokov by sa mali nachádzať v rámci rozsahu, uvedeného v osvedčení kontroly kvality.

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

8.3 Výpočet VIROTECHových jednotiek (VE) (IgG a IgA)

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

$$\begin{aligned} \text{VE}_{\text{(pozitívna kontrola)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(pozitívna kontrola)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \\ \text{VE}_{\text{(sérum pacienta)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(sérum pacienta)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \end{aligned}$$

8.4 Výpočet VIROTECHových jednotiek (VE) (IgM)

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

$$\begin{aligned} \text{VE}_{\text{(pozitívna kontrola)}} &= \frac{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota pozitívnej kontroly)}}{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota kontroly cut - off)}} \times 10 \\ \text{VE}_{\text{(sérum pacienta)}} &= \frac{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota séra pacienta)}}{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota kontroly cut - off)}} \times 10 \end{aligned}$$

Príklad:

- OD na testovacích prúžkoch pozitívnych kontrolných roztokov: 0,853
- OD na referenčných prúžkoch pozitívnych kontrolných roztokov: 0,107
- Rozdiel medzi výslednou hodnotou testu a referenčnou hodnotou pozitívneho kontrolného roztoku: 0,746
- OD na testovacích prúžkoch kontrolných roztokov s hodnotou odstrihnutia (cut-off): 0,341
- OD na referenčných prúžkoch kontrolných roztokov s hodnotou odstrihnutia (cut-off): 0,073
- Rozdiel medzi výslednou hodnotou testu a referenčnou hodnotou kontrolného roztoku s hodnotou odstrihnutia (cut-off): 0,268

$$\text{VE}_{\text{(pozitívna kontrola)}} = \frac{0,746}{0,268} \times 10 = 27,8$$

8.5 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.

8.6 Hranice testu

Imunitná odozva môže byť homotypová alebo heterotypová. Homotypové protilátky sú nasmerované proti sérotypovo špecifickým epitopom, zatiaľ čo heterotypové protilátky rozpoznávajú epitopy, ktoré sú medzi sérotypmi totožné alebo podobné.

ELISA VIROTECH vykazuje krížovo reagujúce, heterotypové protilátky proti enterovírusom s pomocou teplom denaturovaných antigénových preparátov. Pri postavení diagnózy vo vzťahu k prebiehajúcej enterovírusovej infekcie je nutné zohľadniť nasledujúce okolnosti:

1. Charakteristika krížovo reagujúcich epitopov na tepelne deaktivované enterovírusy môže vykazovať kvantitatívne a kvalitatívne rozdiely, a to v závislosti od toho, ktoré sérotypy a ktoré izoláty boli použité pre prípravu antigénov. Zodpovedajúc tomu môže variovať aj spektrum heterotypických protilátok, ktoré sa rozpoznáva odlišnými testovacími systémami.
2. Objemový vzťah homotypických protilátok v sére pacienta k heterotypickým môže byť rôzny. Skúmania Kinga a spol. (6) naznačujú, že v priebehu prvých infekcií enterovírusom v detskom veku sa prednostne tvoria homotypové protilátky a podiel heterotypových protilátok sa zväčší až vo vyššom veku a po prekonaní väčšieho počtu enterovírusových infekcií. U VIROTECH ELISA enterovírus sa môžu v dôsledku toho objaviť negatívne výsledky v takých prípadoch, v ktorých sú heterotypové imunitné reakcie oproti homotypovým len málo vyznačené.
3. Keďže ELISA dokazuje aj polio-pozitívne séra, nedá sa vylúčiť, že existujúci titer po očkovaní povedie k pozitívnemu výsledku.
4. Boli popísané krížové reakcie medzi enterovírusmi a hepatitídou A, Epstein-Barrovým vírusom (EBV), cytomegalovým vírusom (CMV) a vírusmi bežnej nádchy (rhinovírusy) (7).
5. Interpretácia sérologických výsledkov musí vždy zohľadniť klinický obraz, epidemiologické údaje a prípadne ďalšie laboratórne výsledky, ktoré sú k dispozícii.

9. Literatúra

1. Diagnostische Bibliothek: Coxsackie- und Echoviren; In vitro Diagnostica Nachrichten; 24 (1994) 1-8.
2. MIQ 13; Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege; 35-37 (2000).
3. RKI, Übersicht zu Erkrankungen durch Enteroviren, Stand: Mai 2002.
4. Bomann J et al., Serum IgA, IgG und IgM Responses to different Enteroviruses as measured by a Coxsackie B5-based indirect ELISA; J. Med.Virol.; 38:32-35 (1992).
5. Swanink CMA et al., Coxsackie B1-Based Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA with Broad Specificity for Enteroviruses, J. Clin. Microbiol. 31:3240-3246 (1993)
6. King M.J., Bidvell D., Shaikh A., Voller A., Banatvala J.E. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type 1) diabetes mellitus, Lancet i: 1397-9 (1983)
7. Samuelson, A. et al., Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA, Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.; 4:395-406 (1990).

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

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

▼ **Vzorky IgG/IgA - Zriedenie**
1:101

napr.:
10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru
(Pufer na riedenie séra je pripravený na použitie)

▼ **Vzorky IgM – Zriedenie**
1:101

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

napr.:
5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +
1 kvapka prípravku RF-SorboTech inkubovať pri teplote miestnosti 15 min

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)