

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

Bestell-Nr.: EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

Bestell-Nr.: EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

Bestell-Nr.: EC116A00

Farbcodierung: IgG: braun/ dunkelbraun
IgM: Teststreifen braun
IgM: Referenzstreifen braun/transparent
IgA: farblos

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Deutschland

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webseite: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Inhalt

| | |
|--|-----------|
| 1. Verwendungszweck..... | 3 |
| 2. Diagnostische Bedeutung..... | 3 |
| 3. Testprinzip..... | 3 |
| 4. Packungsinhalt | 3 |
| 4.1 IgG Testkit | 3 |
| 4.2 IgA Testkit..... | 4 |
| 4.3 IgM Testkit..... | 4 |
| 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien | 4 |
| 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise..... | 5 |
| 7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)..... | 5 |
| 8. Testdurchführung | 5 |
| 8.1 Untersuchungsmaterial..... | 5 |
| 8.2 Vorbereitung der Reagenzien..... | 5 |
| 8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung..... | 6 |
| 8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren | 6 |
| 9. Testauswertung | 6 |
| 9.1 Testfunktionskontrolle (IgG und IgA)..... | 6 |
| 9.2 Testfunktionskontrolle (IgM) | 7 |
| 9.3 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE) (IgG und IgA)..... | 7 |
| 9.4 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE) (IgM)..... | 7 |
| 9.5 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA | 8 |
| 9.6 Grenzen des Tests | 8 |
| 10. Leistungsdaten | 8 |
| 10.1 Durchseuchung (erwartete Werte) | 8 |
| 10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)..... | 9 |
| 10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit) | 9 |
| 11. Literatur | 9 |
| 12. Testablaufschema..... | 10 |

1. Verwendungszweck

Der ELISA dient dem Nachweis von gruppenspezifischen IgG-, IgA- und IgM-Antikörpern gegen Enteroviren in Humanserum.

2. Diagnostische Bedeutung

Humane Enteroviren sind kleine RNA-Viren, die zur Familie der Picornaviridae (ital. pico klein) gehören. In die Gruppe der Enteroviren werden die Coxsackieviren mit den Untergruppen A (23 Serotypen) und B (6 Serotypen), die Polioviren (3 Serotypen), die Echoviren (31 Serotypen) und die Enteroviren Typ 68-71 eingeordnet (1,3).

Infektionen durch Enteroviren kommen weltweit vor. In gemäßigten Klimazonen tritt eine saisonale Häufung im Spätsommer und Herbst auf. Kinder sind am häufigsten betroffen. Die Übertragung erfolgt vorwiegend auf fäkal-oralem Wege, Tröpfcheninfektion ist ebenfalls möglich. Der Eintrittsort ist gewöhnlich der Respirationstrakt und der Darm. Die Inkubationszeit kann von 12 Stunden bis zu 35 Tagen dauern. Obwohl Enteroviren zu 90-95% asymptomatische Infektionen verursachen, sind sie Erreger einer Reihe klinisch relevanter Erkrankungen. Dazu gehören u.a.: Aseptische Meningitis, Herpangina, Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Hämorrhagische Meningitis und Erkrankungen der Atemwege, sowie der inneren Organe. Alle Enteroviren können uncharakteristische, fieberhafte Infekte hervorrufen, die als „Sommergrippe“ bekannt sind. Sie sind für etwa 15% der Infektionen im oberen Respirationstrakt verantwortlich. Die Therapie erfolgt symptomatisch und richtet sich nach dem betroffenen Organsystem (1,2,3).

In der Diagnostik von Enteroviren hat sich neben dem Antigennachweis der Antikörpernachweis durchgesetzt. Die serologische Untersuchung erfolgt in der Routine mit KBR und ELISA. Spezifische Antikörper sind im Serum während der Akutphase meist früh vorhanden. Eine sichere Aussage zur akuten Infektion ist nur bei signifikanten Titeranstiegen (IgG/IgM) möglich (2). Für Coxsackie B (CVB) konnte gezeigt werden, dass sich eine akute Infektion auch durch die Bestimmung von spezifischem IgA nachweisen lässt (4,5). IgM-Antikörper lassen sich bei CVB-Infektionen in der Regel über einen Zeitraum von 6 bis 8 Wochen nachweisen. In seltenen Fällen kann CVB-IgM auch bei sonst gesunden Personen nach einer aseptischen Meningitis über 6 Monate persistieren. Der Nachweis von CVB-IgM bei sonst gesunden Personen über Monate oder Jahre schließt eine Persistenz des Erregers nicht ohne weiteres aus. In manchen Fällen, insbesondere bei wiederholten Enterovirus-Infektionen, erlaubt nur die gleichzeitige Bestimmung von spezifischem CVB-IgM, -IgA und -IgG eine diagnostische Beurteilung (1,5).

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper (IgG, IgA) bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

Der im Humanserum gesuchte Antikörper (IgM) reagiert wie für IgA und IgG beschrieben. Zusätzlich zur mit Antigen beschichteten Mikrotiterplatte (Teststreifen) wird auch eine zweite Mikrotiterplatte (Referenzstreifen) mitgeführt. Der Unterschied der Farbintensität zwischen Teststreifen und Referenzstreifen ist ein Maß für die Menge gebundener Antikörper.

4. Packungsinhalt

4.1 IgG Testkit

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
9. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.2 IgA Testkit

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgA negative Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgA cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgA positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgA-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
9. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.3 IgM Testkit

Box 1

1. **1 Mikrotiterplatte (Teststreifen)**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 3x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 2x11ml**, gebrauchsfertig

Box 2

1. **1 Mikrotiterplatte (Referenzstreifen)**, bestehend aus 96 beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **IgM negative Kontrolle, 4000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
4. **IgM cut-off Kontrolle, 4000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgM positive Kontrolle, 4000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgM-Konjugat (anti-human), 2x11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
7. **Citrat-Stopplösung, 2x6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

| Material | Zustand | Lagerung | Haltbarkeit |
|---------------------|-------------------------------|--|-------------|
| Untersuchungsproben | verdünnt | +2 bis +8°C | max. 6h |
| | unverdünnt | +2 bis +8°C | 1Woche |
| Kontrollen | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| MTP | nach Öffnen | +2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel) | 3Monate |
| RF Sorbo Tech | unverdünnt, nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| | verdünnt | +2 bis +8°C | 1Woche |
| Konjugat | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| TMB | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| Stopplösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| Waschlösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| | endverdünnt (gebrauchsfertig) | +2 bis +25°C | 4Wochen |

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB, wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material
8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).
5. Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren mit RF-SorboTech (VIROTECH-Adsorptionsmittel) vorzubehandeln.** Bei IgM-Kontrollen entfällt die Voradsorption.

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

Alle zu testenden Proben werden in **IgM** sowohl auf den **Teststreifen** (Enterovirusantigen-Streifen) als auch auf den **Referenzstreifen** (Kontrollantigen-Streifen) ausgetestet. Vor der Austestung wird deshalb die gemäß der Probenzahl benötigte Anzahl von Teststreifen und Referenzstreifen in einer Halterung nebeneinander gesteckt. **Dabei dürfen nur Teststreifen und Referenzstreifen mit den im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Lotnummern miteinander kombiniert werden.**

Testungen auf IgA oder IgG werden nur mit einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG-, IgM- und IgA-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extink-tionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG-, IgM- und IgA-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle (IgG und IgA)

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.2 Testfunktionskontrolle (IgM)

1. Von allen Extinktionswerten der positiven, cut-off und negativen Kontrollen sowie der Patientenseren auf den Teststreifen werden die Leerwerte abgezogen (= "Testwerte").
2. Von allen Extinktionswerten der positiven, cut off und negativen Kontrollen sowie der Patientenseren auf den Referenzstreifen werden die Leerwerte abgezogen (= "Referenzwerte").
3. Für alle positiven, cut off und negativen Kontrollen sowie Patientenseren werden die "**Differenzen Testwerte minus Referenzwerte**" berechnet, indem von den jeweiligen Testwerten die entsprechenden Referenzwerte abgezogen werden.

a) OD-Werte

Die Differenz Testwert - Referenzwert der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die Differenz Testwert – Referenzwert der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

9.3 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE) (IgG und IgA)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

| |
|--|
| $VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD \text{ (positive Kontrolle)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$ |
| $VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{OD \text{ (Patientenserum)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$ |

9.4 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE) (IgM)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

| |
|---|
| $VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{\text{Differenz (Testwert - Referenzwert der positiven Kontrolle)}}{\text{Differenz (Testwert - Referenzwert der cut - off Kontrolle)}} \times 10$ |
| $VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{\text{Differenz (Testwert - Referenzwert des Patientens erums)}}{\text{Differenz (Testwert - Referenzwert der cut - off Kontrolle)}} \times 10$ |

Beispiel:

- OD auf Teststreifen der positiven Kontrolle: 0,853
- OD auf Referenzstreifen der positiven Kontrolle: 0,107
- Differenz Testwert - Referenzwert der positiven Kontrolle: 0,746
- OD auf Teststreifen der cut-off Kontrolle: 0,341
- OD auf Referenzstreifen der cut-off Kontrolle: 0,073
- Differenz Testwert - Referenzwert der cut-off Kontrolle: 0,268

$$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{0,746}{0,268} \times 10 = 27,8$$

9.5 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA

| Ergebnis (VE) | Beurteilung |
|---------------|-------------|
| < 9,0 | negativ |
| 9,0 – 11,0 | grenzwertig |
| > 11,0 | positiv |

- Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
- Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet. Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen. Eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.
- Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.6 Grenzen des Tests

Die Immunantwort kann homotyp oder heterotyp sein. Homotype Antikörper richten sich gegen serotyp-spezifische Epitope während heterotype Antikörper Epitope erkennen, die unter den Serotypen identisch oder ähnlich sind.

Der VIROTECH-ELISA weist kreuzreagierende, heterotypische Antikörper gegen Enteroviren mit Hilfe von hitzedenaturierten Antigenpräparationen nach. Bei der Diagnosestellung hinsichtlich einer vorliegenden Enterovirus-Infektion ist folgendes zu berücksichtigen:

- Die Ausprägung kreuzreagierender Epitope auf hitzeinaktivierten Enteroviren kann quantitative und qualitative Unterschiede aufweisen, je nachdem, welche Serotypen und welche Isolate für die Antigenpräparation verwendet wurden. Dementsprechend kann auch das Spektrum heterotypischer Antikörper variieren, das mit unterschiedlichen Testsystemen erkannt wird.
- Das mengenmäßige Verhältnis von homotypischen zu heterotypischen Antikörpern im Serum der Patienten kann unterschiedlich sein. Untersuchungen von King et al. (6) deuten darauf hin, dass im Verlauf der ersten Enterovirus-Infektionen im Kindesalter bevorzugt homotypische Antikörper gebildet werden und erst mit höherem Alter und der dann größeren Anzahl bereits durchgemachter Enterovirus-Infektionen der Anteil heterotypischer Antikörper zunimmt. Beim VIROTECH-Enterovirus-ELISA können daher negative Ergebnisse in den Fällen auftreten, in denen die heterotypische gegenüber der homotypischen Immunantwort nur schwach ausgeprägt ist.
- Da der ELISA auch Polio positive Seren nachweist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein vorhandener Impftiter zu einem positiven Ergebnis führt.
- Es sind Kreuzreaktionen zwischen Enteroviren und Hepatitis A, Epstein-Barr-Virus (EBV), Cytomegalie-Virus (CMV) und Rhinoviren beschrieben worden (7).
- Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

10. Leistungsdaten

10.1 Durchsuchung (erwartete Werte)

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Blutspenderseren für IgG (n=119), IgM (n=80) und IgA (n=120)

| | IgG | IgM | IgA |
|---------|-----|-----|-----|
| Negativ | 86 | 80 | 116 |

| | | | |
|-------------|----|---|---|
| Grenzwertig | 13 | 0 | 1 |
| Positiv | 20 | 0 | 3 |

10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt bei

IgG: < 9% (bei einem mittleren OD - Wert von 0,72)

IgM: < 9% (bei einem mittleren OD - Wert von 0,48)

IgA: < 9% (bei einem mittleren OD - Wert von 0,47)

10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

Enterovirus ELISA IgG

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet.

| Serum | Mittelwert VE | Variationskoeffizient |
|---------|---------------|-----------------------|
| Negativ | 3,9 | 11,5% |
| Negativ | 4,7 | 10,8% |
| Positiv | 15,0 | 10,9% |

Enterovirus ELISA IgM

In 14 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 3 Seren getestet.

| Serum | Mittelwert VE | Variationskoeffizient |
|-------------|---------------|-----------------------|
| Negativ | 4,2 | 8,6% |
| Grenzwertig | 10,6 | 9,1% |
| Positiv | 13,3 | 8,4% |

Enterovirus ELISA IgA

In 14 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 2 Seren getestet.

| Serum | Mittelwert VE | Variationskoeffizient |
|---------|---------------|-----------------------|
| Negativ | 4,5 | 6,3% |
| Positiv | 12,5 | 9,1% |

11. Literatur

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).

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-/IgA-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:
10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

▼ **IgM-Proben – Verdünnung**
1:101

Rheumafaktoradsorption mit RF-SorboTech

z.B.:
5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

Testdurchführung

