

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

objednací číslo :EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

objednací číslo :EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

objednací číslo :EC116A00

barevné kódování : IgG: hnědá / tmavý hnědý
IgM: testovací pruh hnědý
IgM: referenční pruh hnědý / transparentní
IgA: bezbarvá

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

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 použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy	3
3.1 Testovací kit IgG	3
3.2 Testovací kit IgA	3
3.3 Testovací kit IgM	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	4
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)	5
7. Testování	5
7.1 Testovaný materiál	5
7.2 Příprava reagensů	5
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH	5
7.4 Použití analyzátorů ELISA	6
8. Vyhodnocení testů	6
8.1 Kontrola funkčnosti testu (IgG a IgA)	6
8.2 Kontrola funkčnosti testu (IgM)	6
8.3 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	7
8.4 Výpočet jednotek VIROTECH (VE) (IgM)	7
8.5 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA	7
8.6 Meze testu	8
9. Literatura	8
10. Schéma provedení testu	9

1. Účel použití

Tento přípravek ELISA slouží k prokazování skupinové specifických protilátek IgG, IgA a IgM proti enterovirům v lidském séru.

2. Princip testu

Protilátka (IgG, IgA) hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrovací destičce imunokomplex.

Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí.

Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

Protilátka (IgM) hledaná v lidském séru reaguje tak jak je popsáno pro IgA a IgG. Spolu s antigenem povrstvenou mikrotitrovací destičkou (testovací proužky) je dodána také druhá mikrotitrovací destička (referenční proužky). Rozdíl v barevné intenzitě mezi testovacími a referenčními proužky je měřítkem množství vázaných protilátek.

3. Obsah soupravy

3.1 Testovací kit IgG

1. **1 mikrotitrovací destička**, sestávající z 96 odlomitelných jednotlivých dutinek (kavit), povrstvených antigenem, lyofilizovaná,
2. **zředovací pufr PBS (modrý, v použití schopném stavu), 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50 ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **negativní kontrola IgG, 2000 µl** lidského séra se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
5. **hraniční kontrola IgG cut-off, 2000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
6. **pozitivní kontrola IgG, 2000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
7. **konjugát IgG (antihumánní), 11 ml**, (ovčí nebo ostrucha křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
8. **roztok substrátu v tetrametylbenzidinu (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin), 11 ml**, v použití schopném stavu,
9. **citronanový zastavovací roztok, 6 ml**, obsahující směs kyselin.

3.2 Testovací kit IgA

1. **1 mikrotitrovací destička**, sestávající z 96 odlomitelných jednotlivých dutinek (kavit), povrstvených antigenem, lyofilizovaná,
2. **zředovací pufr PBS (modrý, v použití schopném stavu), 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50 ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **negativní kontrola IgA, 2000 µl** lidského séra se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
5. **hraniční kontrola IgA cut-off, 2000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
6. **pozitivní kontrola IgA, 2000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
7. **konjugát IgA (antihumánní), 11 ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha křivočará) křen - peroxidáza s FCS a konzervačním prostředkem v tris- pufru, v použití schopném stavu,
8. **roztok substrátu v tetrametylbenzidinu (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin), 11 ml**, v použití schopném stavu,
9. **citronanový zastavovací roztok, 6 ml**, obsahující směs kyselin.

3.3 Testovací kit IgM

Box 1

1. **1 mikrotitrovací destička (testovací proužky)**, sestávající z 96 odlomitelných jednotlivých dutinek (kavit), povrstvených antigenem, lyofilizovaná,
2. **zředovací pufr PBS (modrý, v použití schopném stavu)**, 3 x 50 ml, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **roztok substrátu v tetrametylbenzidinu (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin)**, 2 x 11 ml, v použití schopném stavu,

Box 2

1. **1 mikrotitrovací destička (referenční proužky)**, sestávající z 96 jednotlivých povrstvených odlomitelných dutinek (kavit), lyofilizovaná,
2. **promývací roztok PBS (20x koncentrovaný)** 2 x 50 ml, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **negativní kontrola IgM, 4000 µl** lidského séra se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
4. **hraniční kontrola IgM cut-off, 4000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
5. **pozitivní kontrola IgM, 4000 µl**, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, v použití schopném stavu,
6. **konjugát IgM (antihumánní), 2 x 11 ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha křivočará) křen - peroxidáza s FCS a konzervačním prostředkem v tris- pufru, v použití schopném stavu,
7. **citronanový zastavovací roztok, 2 x 6 ml**, obsahující směs kyselin.

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba expirace jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba expirace soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová mikropipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buničiny
6. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního předpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení .

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagensů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s šarží destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započítím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu .
3. Všechny tekuté reagensie před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou narušit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá předběžná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

Všechny vzorky, které mají být testovány, je třeba v testu **IgM** otestovat jak na **testovacích prouzcích** (prouzcích s antigeny enterovirů), tak i na **referenčních prouzcích** (prouzky s kontrolním antigenem). Před provedením testu je proto třeba umístit vedle sebe do držáku potřebný počet testovacích prouzků a referenčních prouzků podle počtu vzorků. **Přitom smí být spolu kombinovány pouze testovací prouzky a referenční prouzky s čísly sérií uvedenými v certifikátu o kontrole kvality.**

Testy na IgA nebo IgG jsou prováděny pouze s jednou mikrotitrovací destičkou.

1. Do označených jamek napipetujte 100µl zředovacího pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG, IgM a IgA, a naředěných sér pacienta. Doporučujeme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např. 10µl sérum + 1ml zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.

4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po Inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o odečteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testů

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG, IgA a IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkyvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkčnosti testu (IgG a IgA)

a) Hodnoty optické hustoty

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické hustoty negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické hustoty uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i hraničních kontrol cut-off by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) hraničních kontrol cut-off jsou definovány 10 VE. Vypočtené VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Kontrola funkčnosti testu (IgM)

1. Od všech hodnot extinkcí pozitivních, hraničních cut-off a negativních kontrol, jakož i hodnot sér pacientů na testovacích prouzcích se odečtou prázdné hodnoty ("testovací hodnoty").
2. Od všech hodnot extinkcí pozitivních, hraničních cut-off a negativních kontrol, jakož i hodnot sér pacientů na referenčních prouzcích se odečtou prázdné hodnoty ("referenční hodnoty").
3. Pro všechny pozitivní, hraničních cut-off a negativní kontroly, jakož i séra pacientů se vypočtou "**rozdíly testovacích hodnot minus referenčních hodnot**", a to tak, že od příslušných testovacích hodnot budou odečteny odpovídající referenční hodnoty.

a) hodnoty OD

Rozdíly mezi testovací hodnotou a referenční hodnotou negativních kontrol by měly být pod hodnotami OD uvedenými v certifikátu o kontrole kvality, rozdíl mezi testovací hodnotou a referenční hodnotou pozitivních kontrol jakož i hraničních kontrol cut-off by měly být nad hodnotami OD uvedenými v certifikátu o kontrole kvality.

b) jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) hraničních kontrol cut-off jsou definovány s 10 VE. Vypočtené VE pozitivních kontrol by měly ležet uvnitř oblastí uvedených v certifikátu o kontrole kvality.

Nejsou-li tyto požadavky (hodnoty OD, VE) splněny, je třeba test opakovat.

8.3 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{OD hraniční}} \times 10 \end{aligned}$$

8.4 Výpočet jednotek VIROTECH (VE) (IgM)

Extinkce prázdné hodnoty (450 / 620 nm) musí být odečtena od všech extinkcí.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{pozitivní kontrola})} &= \frac{\text{rozdíl (test. hodnota - referenč. hodnota pozitivní kontroly)}}{\text{rozdíl (test. hodnota - referenč. hodnota hraniční kontroly cut - off)}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{sérumpacienta})} &= \frac{\text{rozdíl (test. hodnota - referenč. hodnota séra pacienta)}}{\text{rozdíl (test. hodnota - referenč. hodnota hraniční kontroly cut - off)}} \times 10 \end{aligned}$$

Příklad :

- OD na testovacím proužku pozitivní kontroly : 0,853
- OD na referenčním proužku pozitivní kontroly : 0,107
- rozdíl testovací hodn. - referenční hodnota pozitivní kontroly : 0,746
- OD na testovacím proužku hraniční kontroly cut-off : 0,341
- OD na referenčním proužku hraniční kontroly cut-off : 0,073
- rozdíl testovací hodn.- referenční hodnoty hr. kontroly cut-off : 0,268

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

8.5 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA

Výsledek (VE)	Posouzení
< 9,0	negativní
9,0 - 11,0	hraniční hodnoty
> 11,0	pozitivní

1. Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.

2. Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporčuje se tyto vzorky opakovaně testovat z nového odběru. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací várce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
3. Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.

8.6 Meze testu

Imunologická odpověď může být homotyp nebo heterotyp. Homeotypické protilátky se zaměřují na epitopy specifické pro sérotyp, zatímco heterotypické protilátky rozpoznávají epitopy, které jsou pro sérotypy identické nebo podobné.

Test VIROTECH-ELISA dokazuje křížové reagující heterotypické protilátky proti enterovírům. pomocí horkem denaturovaných antigenových preparátů. Při stanovení diagnózy ohledně existence enterovirové infekce je třeba zohlednit následující skutečnosti :

1. Výraznost reakce křížově reagujících epitopů na horkem deaktivované enteroviry může vykazovat kvantitativní a kvalitativní rozdíly, podle toho, jaké typy sér a které izoláty byly použity pro preparaci antigenů. Tomu odpovídajíc může také variovat také spektrum heterotypických protilátek, které je rozeznáváno různými testovacími systémy.
2. Množstevní poměr homotypických k heterotypickým protilátkám v séru pacientů může být rozdílný. Zkoumání Kinga et al. (6) naznačují, že v průběhu první enterovirové infekce v dětském věku se tvoří přednostně homotypické protilátky, a teprve ve vyšším věku a po vyšším počtu prodělaných enterovirových infekcí přibývá podíl heterotypických protilátek. Při aplikaci testu VIROTECH-Enterovirus-ELISA proto mohou nastat negativní výsledky v těch případech, ve kterých je heterotypická imunitní odpověď oproti homotypické imunitní odpovědi jen slabě výrazná.
3. Protože test ELISA prokazuje i Polio-pozitivní séra, nelze vyloučit, že k pozitivnímu výsledku může vést i případně obsažený titr vyvolaný očkováním.
4. Mezi enteroviry a hepatitidou A, Epstein-Barrovým virem (EBV), cytomegalickým virem (CMV) a rinoviry byly popsány křížové reakce (7).
5. K interpretaci sérologických výsledků by měl být vždy přibrán klinický obraz, epidemiologické údaje a eventuálně i další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

9. Literatura

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).

Příprava vzorků a promývacího roztoku

▼ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

▼ **zředění vzorky IgG/IgA**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

▼ **zředění vzorky IgM**
1:101

**adsorpce revmatoidního faktoru pomocí
RF-SorboTech**

např.:

5 µl séra/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +
1 kapka RF- SorboTech , inkubace při pokojové teplotě
po dobu 15 minut

Schéma průběhu testu

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu
IgG, IgM, IgA

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

**mikrofotometr při
450/620nm
(Délka referenční vlny 620-690nm)**