

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

Obj. | :EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

Obj. | :EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

Obj. | :EC116A00

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

POUŽÍVAŠ 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>



Freigabedatum: 31.1.2019

REV 3 / VIROTECH Enterovirus IgG & IgM & IgA ELISA SK

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 Vyčistený 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 mikrotitraľnej 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 mikrotitraľnej doske (testovaciemu prúžku) potiahnutej vrstvou antigénu sa navyše realizuje aj druhá mikrotitraľná 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 mikrotitraľná 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 mikrotitraľná 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 teľacím 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 mikrotitraľná 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 a roztok substrátu (3,3',5,5'TMB)**, 11 ml, pripravený na použitie

Krabica 2

1. **1 mikrotitraľná doska (referenľný prŕgok)**, pozostávajúca z 96 jednotlivodlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom
2. Premývací roztok PBS (20 x koncentrovaný), 50 ml, pH 7,2 s konzervaľným prostriedkom a Tween 20.
3. **IgM negatívne kontrolné sérum, 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervaľným prostriedkom, pripravené na pouľitie
4. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervaľným prostriedkom, pripravené na pouľitie
5. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 4000 µl**, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervaľným prostriedkom, pripravené na pouľitie
6. **IgM konjugát (antihumánny), 2 x 11 ml**, (ovľ í alebo kozľ) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teľčím sérum) a konzervaľným prostriedkom v Tris pufri, pripravený na pouľitie
7. Zastavovací roztok citrónanu, 2 x 6 ml, obsahuje zmes kyselín

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensŕ pripravených na pouľitie

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

1. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prŕgky v uzavretom vrecku s pohlcovaľom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneľ po pouľití znovu skladujte pri 2-8 °C.
2. Konjugát pripravený na pouľitie 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 pouľitie, 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
Skúľobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týľdeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitraľná platňka	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 týľdeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbendizín (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 pouľitie)	+2 až +25 °C	4 týľdne

5. Bezpeľnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako kontrolné séra sa pouľivajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitidy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné vľetky vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitraľné prŕgky považovať za potenciálne infekľný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia prísluľné smernice pre laboratórne práce.
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervaľný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráľdivo na pokožku, oľ i a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneľ umyť veľcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia pouľitých materiálov sa uskutoľňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanáľová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky

5. Rúgok z buniť iný
6. Kryt platní iek 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. Vykonalie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Vyšetřovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulantů tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy prvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné..

1. Používajte len prvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

7.2 Příprava reagentů

Diagnostickeý 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 gárga. Kontrolné roztoky pripravené na použitie (pozitívne kontrolné séra s hodnotou odstřihnutia - cut-off, negatívne kontrolné séra) sa musia použiť podľa špecifických parametrov a výhradne s platňou, ktorej gárga je uvedená v certifikáte kontroly kvality.

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagenty zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúčkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potreste.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentrácii tvoria kryštály, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potreste).
5. Vysoké IgG titry 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

Všetky vzorky určené k testovaniu sa otestujú v IgM, ako aj na testovacích prúčkoch (prúčky s antigénom enterovírusu) ako aj na referenčných prúčkoch (prúčky s kontrolným antigénom). Preto sa pred otestovaním príslušný počet testovacích prúčkov a referenčných prúčkov, zodpovedajúci počtu vzoriek, zastreší vedľa seba do držiaka. **Prítom sa smú navzájom kombinovať testovacie prúčky s rovnakým ísлом gárga, 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 dvojité sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá 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 vyklopaním na buniťinovú podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (príkryté).
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 nepremieňajú 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 odpútala 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 a nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. v jeho opravách vážneho procesora ELISA odporúča a firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôhu výrobcu prístroja.
2. Odporúča a sa procesor ELISA následne vyskúša pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúvanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrtroka.
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 zabezpečí uje bezchybnú funkciu vážneho procesoru 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 vyrovnávajú, 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. Výpočítané 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 odpútajú nameraná hodnota slepého pokusu (= **Ďtestovacie hodnoty**).
2. Od všetkých extinkcií pozitívnych, cut-off a negatívnych kontrolných roztokov, ako aj sér pacientov na referenčných prúžkoch sa odpútajú nameraná hodnota slepého pokusu (= **ĎReferenčné hodnoty**).
3. Pre všetky pozitívne, cut-off a negatívne kontrolné séra, ako aj séra pacientov sa vypočítajú **Ďrozdiely medzi výslednými hodnotami testu a referenčnými hodnotami** tak, že sa od jednotlivých výsledných hodnôt testu odpútajú 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 odpovíadať šod všetkých extinkcií

$$VE_{\text{(pozitívna kontrola)}} = \frac{OD_{\text{(pozitívna kontrola)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(sérum pacienta)}} = \frac{OD_{\text{(sérum pacienta)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

8.4 Výpočet VIROTECHových jednotiek (VE) (IgM)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpovíadať šod všetkých extinkcií.

$$VE_{\text{(pozitívna kontrola)}} = \frac{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota pozitívnej kontroly)}}{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota kontroly cut - off)}} \times 10$$
$$VE_{\text{(sérum pacienta)}} = \frac{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota séra pacienta)}}{\text{Rozdiel (hodnota testu - refer.hodnota kontroly cut - off)}} \times 10$$

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

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

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 špeciálne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť špecifickú 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 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 zväčšuje 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 význačné.
3. Keďže ELISA dokazuje aj polio-pozitívne séra, nedá sa vylúčiť, že existujúci titer po ukončení kovaní 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 dáta 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

Σ **Premývací roztok:** Koncentrát doplníŠna 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

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

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

Σ **Vzorky IgM ĩ Zriedenie**
1:101

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

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

Vykonanie testu

