

VIROTECH Influenza A IgG/IgM ELISA
(Influenza A IgG/IgM ELISA)

Bestell-Nr.: EC118.00

VIROTECH Influenza A IgA ELISA
(Influenza A IgA ELISA)

Bestell-Nr.: EC118A00

VIROTECH Influenza B IgG/IgM ELISA
(Influenza B IgG/IgM ELISA)

Bestell-Nr.: EC119.00

VIROTECH Influenza B IgA ELISA
(Influenza B IgA ELISA)

Bestell-Nr.: EC119A00

Farbcodierung: Influenza A:	IgG/IgM:	hellblau
	IgA:	hellblau / schwarz
Influenza B:	IgG/IgM:	hellblau / transparent
	IgA:	hellblau / rot

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt.....	3
4.1 IgG/IgM Testkit.....	3
4.2 IgA Testkit.....	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
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.....	5
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung.....	6
9.1 Testfunktionskontrolle	6
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE).....	6
9.3 Interpretation der Ergebnisse	6
9.4 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA	7
9.5 Grenzen des Tests.....	7
10. Leistungsdaten.....	7
10.1 Sensitivität und Spezifität	7
10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)	8
10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	9
10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	9
11. Literatur.....	10
12. Testablaufschemata.....	11

1. Verwendungszweck

Die Influenza ELISAs dienen zum Nachweis von humanen Influenza A bzw. Influenza B Virus Antikörpern in Serum. Zum Nachweis von Impfantikörpern und frischen Infektionen werden native Kernantigene, wie auch rekombinante Hämagglutinine (HA) eingesetzt. Die rekombinanten Hämagglutinine werden jährlich aktualisiert (Influenza A: A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1) -like virus, A/Hawaii/70/2019/ (H1N1)-like virus; Influenza B: B/Washington/02/2019-like virus).

2. Diagnostische Bedeutung

Der Erreger der Influenza A/B- Virus Grippe gehört zu den Orthomyxoviren. Charakteristisch für Influenza Viren ist eine ausgesprochen hohe genetische Variabilität, beruhend auf einer überdurchschnittlichen Mutationsfrequenz und der Fähigkeit des Genaustausches. Diese Fähigkeiten führen zu den für die Influenza typischen Epidemien und Endemien. Influenza Virus Infektionen sind weltweit verbreitet, wobei neben dem Menschen bei Influenza A Vögel und Säugetiere ein weiteres natürliches Reservoir darstellen.

Aufgrund der hohen genetischen Variabilität der Influenza Viren muss die Zusammensetzung des Influenza Impfstoffes regelmäßig aktualisiert werden. Referenzlaboratorien auf der ganzen Welt analysieren kontinuierlich die zirkulierenden Influenzaviren und übermitteln ihre Daten an die Weltgesundheitsorganisation (WHO). Auf Basis dieser Daten veröffentlicht die WHO jährlich eine Impfstoffempfehlung für die südliche und nördliche Hemisphäre. Für die nördliche Hemisphäre lautet diese in der Saison 2020/2021 für Dreikomponentenimpfstoffe: Influenza A: A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)-like virus, A/Hawaii/70/2019/ (H1N1)-like virus; Influenza B: B/Washington/02/2019-like virus (4).

Die Grippe (Influenza) ist eine akute Atemwegsinfektion. Die Übertragung erfolgt aerogen mit einer hohen Kontagiosität. Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Tage. In der nördlichen Hemisphäre tritt die Grippe vorwiegend zwischen Dezember und April auf, sporadische Fälle werden ganzjährig beobachtet.

Die Frühdiagnose einer Influenza Infektion gelingt am besten mit einem Erregernachweis (Kultur/ PCR/ EIA/ IFT) aus Nasen- und Rachenabstrichen (2). Die Anzucht des Erregers mit anschließendem immunhistologischen Nachweis mittels monoklonaler Antikörper gilt als Goldstandard für den direkten Antigennachweis.

In der serologischen Diagnostik dienen der ELISA und die KBR zum Nachweis von typspezifischen Antikörpern (2) und zur Differenzierung der einzelnen Immunglobulinklassen. Die Bestimmung von subtyp-spezifischen Antikörpern ist für die klinische Diagnostik aufgrund der hohen Variabilität und einer Durchseuchungsrate von 50 % (3) ohne Bedeutung. Ein IgG-Antikörper Titer kann nur den Kontakt mit dem Antigen anzeigen, dabei besteht aber nicht zwangsläufig eine Immunität. Dies gilt ebenfalls für nachgewiesene Impftiter (1). Zur Diagnostik eines akuten Geschehens ist die Serologie nur bedingt einsetzbar, da die Antikörper im allgemeinen erst 2-3 Wochen nach Krankheitsbeginn auftreten (2). Eine erhöhte Aussagekraft erhalten sie bei epidemiologischen Erhebungen.

3. Testprinzip

Der im Humanserum gesuchte Antikörper 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.

4. Packungsinhalt

4.1 IgG/IgM 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, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgM negative Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgM cut-off Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

9. **IgM positive Kontrolle, 1300µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
11. **IgM-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin - Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

4.2 IgA Testkit

14. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
 15. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
 16. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
 17. **IgA negative Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
 18. **IgA cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
 19. **IgA positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
 20. **IgA-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit FCS und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
 21. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
 22. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch
- Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

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-Stopp-Lösung 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 VIROTECH Diagnostics 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 Diagnostics 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

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

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, 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- IgA-und IgM-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

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 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

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

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

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

9.3 Interpretation der Ergebnisse

IgG Antikörper treten bei Influenza etwa 2-3 Wochen nach der Infektion auf (2). Ein positives Ergebnis kann somit einen Hinweis auf eine akute oder kürzlich durchgemachte Infektion geben (Impfmanagement beachten!). Dabei sind diese Ergebnisse aber immer nur als ein weiterer Diagnosebaustein innerhalb einer Gesamtbefundung zu bewerten. Eine endgültige

Diagnose ist daher nur unter Einbeziehung von Anamnese, Klinik und Labordaten möglich. Das Auftreten erhöhter IgA- und IgM- Titer kann ein zusätzlicher Hinweis auf eine frische Infektion sein. Sie treten auch bei Reinfektionen auf und können bis zu einem Jahr persistieren.

Um die Influenza Diagnostik sicherer zu gestalten, ist es vorteilhaft, Titerbewegungen in den Ig-Klassen zu erkennen. Die Untersuchung von Titerverläufen (Erstserum kurz nach Infektion, Zweitserum 14 Tage danach) kann bei unklaren Diagnosen eine Interpretationshilfe darstellen.

9.4 Auswertungsschema IgG, IgM und IgA

Ergebnis (VE)	Beurteilung	Interpretation
< 9,0	Negativ	Antikörper ohne signifikante Konzentration
9,0 - 11,0	Grenzwertig	Keine signifikant erhöhte Antikörperkonzentration Testung wiederholen, gegebenenfalls 2. Serumprobe anfordern
> 11,0	Positiv	Signifikant erhöhte Antikörperkonzentration - Hinweis auf frische Infektion - Hinweis auf eine durchgemachte Infektion - Impfantikörper

9.5 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Zur Evaluierung der Influenza ELISAs standen keine Seren von Patienten mit akuter Influenza-Infektion zur Verfügung. Die Leistungsdaten beruhen deswegen auf Austestungen von Impfseren und Blutspenderseren.
3. Es können Kreuzreaktivitäten zwischen Influenza A und Influenza B auftreten.
4. Das RKI empfiehlt, dass bei Fortbestehen des klinischen Verdachtes ein negatives labordiagnostisches Ergebnis kurzfristig wiederholt werden sollte.
5. Durch den Einsatz der aktuellen rekombinanten HA Antigene haben sich die Leistungsdaten nicht geändert. Es ist möglich, dass der Einsatz dieser Antigene bei einigen Seren zu einer Verbesserung der Diagnostik führt.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

Influenza A ELISA

Die diagnostische Leistungsfähigkeit wurde mit einem Serenpanel aus 112 Seren bestimmt. Diese wurden im VIROTECH Influenza A IgG/IgM/IgA ELISA und im ELISA eines Mitbewerbers getestet.

Influenza A IgG

n = 81		Mitbewerber	
		Pos	Neg
VIROTECH	Pos	68	0
	Neg	2	11

PPA: 97%

NPA: 100%

Die diagnostische Sensitivität liegt bei 97%, die diagnostische Spezifität bei 100%. Als grenzwertig bewertete Seren wurden bei der Berechnung der Leistungsparameter nicht berücksichtigt. Im Test des Mitbewerbers zeigten 24 von 112 (21%) Proben ein grenzwertiges Ergebnis, im VIROTECH Test waren es 13 von 112 (12%) Proben.

Influenza A IgM

n = 89		Mitbewerber	
		Pos	Neg
VIROTECH	Pos	28	3
	Neg	0	58

PPA: 100%

NPA: 95%

Die diagnostische Sensitivität liegt bei 100%, die diagnostische Spezifität bei 95%. Als grenzwertig bewertete Seren wurden bei der Berechnung der Leistungsparameter nicht berücksichtigt. Im Test des Mitbewerbers zeigten 11 von 112 (10%) Proben ein grenzwertiges Ergebnis, im VIROTECH Test waren es 15 von 112 (13%) Proben.

Influenza A IgA

n = 87		Mitbewerber	
		Pos	Neg
VIROTECH	Pos	29	3
	Neg	5	50

PPA: 85%

NPA: 94%

Die diagnostische Sensitivität liegt bei 85%, die diagnostische Spezifität bei 94%. Als grenzwertig bewertete Seren wurden bei der Berechnung der Leistungsparameter nicht berücksichtigt. Im Test des Mitbewerbers zeigten 13 von 112 (12%) Proben ein grenzwertiges Ergebnis, im VIROTECH Test waren es 14 von 112 (13%) Proben.

Influenza B ELISA

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden Seren im VIROTECH ELISA und im ELISA eines Mitbewerbers getestet.

- Im IgG wurden 83 Seren getestet. Die errechnete Sensitivität liegt bei 77%, die errechnete Spezifität bei >99,9%.
- Im IgM wurden 88 Seren getestet. Die errechnete Sensitivität liegt bei 89%, die errechnete Spezifität bei >99,9%.
- Im IgA wurden 85 Seren getestet. Die errechnete Spezifität liegt bei 89%. Aufgrund fehlender positiver Seren kann zur Sensitivität im IgA keine Angabe gemacht werden.

10.2 Durchseuchung (erwartete Werte)

Influenza A ELISA

Zur Bestimmung der Durchseuchung wurden 78 Seren gesunder Blutspender im VIROTECH Influenza A IgG/IgM/IgA ELISA getestet.

n = 78	IgG	IgM	IgA
negativ	30	67	66
grenzwertig	24	6	5
positiv	24	5	7

Die Prävalenz von Influenza A-spezifischen IgG-Antikörpern bei gesunden Blutspendern liegt damit bei 61,5%, wobei grenzwertige Seren als positiv bewertet wurden. Dieses Ergebnis liegt sehr nahe an der in der Literatur beschriebenen Durchseuchungsrate von 50% (3).

Zur Bestimmung der Durchseuchung von Influenza A-spezifischen IgG-Antikörpern bei geimpften Personen wurde 46 Seren von Impfungen im Influenza A IgG ELISA getestet. Die Prävalenz von Influenza A-spezifischen IgG-Antikörpern bei geimpften Personen liegt bei 100%, wobei grenzwertige Seren (1 von 46) als positiv bewertet wurden.

Influenza B ELISA

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse von Blutspenderseren:

	IgG n=78		IgM n=78		IgA n=78	
	Anz.	%	Anz.	%	Anz.	%
Negativ	47	60	75	96	75	96
Grenzwertig	11	14	0	0	3	4
Positiv	20	26	3	4	0	0

10.3 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit) und

10.4 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

Influenza A ELISA

Ein Präzisionsprobenpanel, bestehend aus Proben, die den diagnostisch relevanten Messbereich vollständig erfassen (1x 2-6 VE, 1x 6-11 VE, 1x 9-14 VE und 1x 14-25 VE), wurde in insgesamt 10 unabhängigen Durchläufen über einen Zeitraum von 4 Tagen getestet. Die Tests wurden individuell von drei verschiedenen Personen durchgeführt. Wiederholbarkeit (Intra-Assay-Variationskoeffizient) und Reproduzierbarkeit (Inter-Assay-Variationskoeffizient) wurden berechnet.

Wiederholbarkeit: Innerhalb des diagnostisch signifikanten Testbereichs um den Cut off liegt die Wiederholbarkeit für alle IgX-Klassen unter 8%.

Reproduzierbarkeit: Innerhalb des diagnostisch signifikanten Testbereichs um den Cut off liegt die Reproduzierbarkeit für alle IgX-Klassen unter 11%.

VIROTECH Influenza A IgG ELISA

		Wiederholbarkeit		Reproduzierbarkeit	
	Mittelwert VE	SD	% VK	SD	% VK
Probe 1	5,8	0,2	3,6	0,3	5,2
Probe 2	8,7	0,3	3,0	0,5	5,5
Probe 3	12,5	0,3	2,6	0,8	6,4
Probe 4	17,3	0,4	2,2	1,1	6,5

VIROTECH Influenza A IgM ELISA

		Wiederholbarkeit		Reproduzierbarkeit	
	Mittelwert VE	SD	% VK	SD	% VK
Probe 1	5,4	0,2	4,2	0,3	4,9
Probe 2	9,4	0,3	3,7	0,7	7,3
Probe 3	13,0	0,4	3,1	0,8	6,3
Probe 4	18,5	0,8	4,1	1,2	6,4

VIROTECH Influenza A IgA ELISA

		Wiederholbarkeit		Reproduzierbarkeit	
	Mittelwert VE	SD	% VK	SD	% VK
Probe 1	3,6	0,3	7,1	0,4	10,1
Probe 2	8,4	0,3	3,3	0,8	9,5
Probe 3	9,5	0,4	4,6	0,5	5,6
Probe 4	21,4	0,7	3,0	1,2	5,8

Influenza B ELISA

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit zwei Seren schachbrettartig getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient ist bei Influenza B IgG, IgM, IgA < 9%.

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von verschiedenen Testpersonen 4 Seren getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient ist bei Influenza B < 15%.

11. Literatur

1. Epidemiologisches Bulletin, Nr.17.2003
2. Labor und Diagnose, L.Thomas , 5.Auflage, 1998
3. Mikrobiologische Diagnostik und Krankenhaushygiene, Max v. Pettenkofer-Institut, 2. Ausgabe 2003
4. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2020 - 2021 northern hemisphere influenza season; February 2020

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

