

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

Nr zamówienia: EC118.00

VIROTECH Influenza A IgA ELISA
(Influenza A IgA ELISA)

Nr zamówienia: EC118A00

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

Nr zamówienia: EC119.00

VIROTECH Influenza B IgA ELISA
(Influenza B IgA ELISA)

Nr zamówienia: EC119A00

Kod barwny:	Influenza A:	IgG/IgM:	jasnoniebieski
		IgA:	jasnoniebieski / czarny
	Influenza B:	IgG/IgM:	jasnoniebieski / przezroczysty
		IgA:	jasnoniebieski / czerwony

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

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



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw do oznaczania IgG / IgM	3
3.2 Zestaw do oznaczania IgA	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	4
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania.....	4
7.1 Materiał do badań	5
7.2 Przygotowanie odczynników	5
7.3 Przeprowadzenie testu Virotech ELISA.....	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA.....	5
8. Ocena wyników badania	6
8.1 Kontrola badania.....	6
8.2 Obliczenie Jednostek Virotech (VE)	6
8.3 Interpretacja wyników.....	6
8.4 Schemat oceny IgG, IgM i IgA.....	7
8.5 Ograniczenia testu	7
9. Literatura.....	7
10. Schemat przebiegu badania	8

1. Cel zastosowania

Testy ELISA Grypa służą do oznaczenia przeciwciał przeciw wirusom ludzkiej grypy typu A lub grypy typu B w surowicy. Do oznaczenia przeciwciał poszczepiennych i świeżych zakażeń stosowane są natywne antygeny rdzeniowe, jak również rekombinowana hemaglutynina (HA). Hemaglutynina rekombinowana jest aktualizowana co roku (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. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw do oznaczania IgG / IgM

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **IgM kontrola negatywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
8. **IgM kontrola cut-off, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
9. **IgM kontrola pozytywna, 1300µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
10. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
11. **koniugat IgM (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzanowej z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
12. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
13. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanekę kwasów

3.2 Zestaw do oznaczania IgA

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 łamliwych dołków opłaszczonych antygenami, liofilizowane
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia), 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony), 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgA kontrola negatywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgA kontrola cut-off, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgA kontrola pozytywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgA (anty-human), 11 ml**, koniugat znaczonej (owczej lub koza) peroksydazą chrzanową z FCS i środkami konserwującymi w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzydyna - roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanekę kwasów

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

- Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
- Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
- Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

- Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
- Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
- Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

- woda destylowana/demin.
- pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
- mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
- próbówki
- chusty z masy celulozowej
- przykrywka płytek ELISA
- pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
- ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
- spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
- inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
5. Wysokie miana IgG lub czynniki reumatoidalne (RF) mogą zaburzyć specyficzne oznaczenie przeciwciał IgM oraz prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. **Surowice potraktować wstępnie RF-SorboTech** (adsorbentem firmy VIROTECH). W kontrolach IgM nie ma wstępnej adsorpcji.

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG, IgM i IgA oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, IgA i IgM, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągana jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{\text{(kontrola pozytywna)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \\ \text{VE}_{\text{(surowica pacjenta)}} &= \frac{\text{OD}_{\text{(surowica pacjenta)}}}{\text{OD}_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Interpretacja wyników

Przeciwciała IgG występują w przypadku grypy około 2-3 tygodnie po zakażeniu (2). Pozytywny wynik może tym samym wskazywać na ostre lub niedawno przebyte zakażenie (zwrócić uwagę na kalendarz szczepień!). Wyniki te należy przy tym zawsze oceniać tylko jako jeden z elementów diagnostyki w całkowitej diagnozie. Ostateczne rozpoznanie jest w związku z tym możliwe tylko przy uwzględnieniu wywiadu chorobowego, danych klinicznych i laboratoryjnych. Występowanie podwyższonych mian IgA i IgM może być dodatkowym wskazaniem świeżego zakażenia. Występują one także w przypadku zakażeń powtórnych i mogą utrzymywać się aż do roku.

W celu bardziej pewnego ukształtowania diagnostyki, korzystne jest rozpoznanie zmian miana w klasach IgG. Badanie zmian miana (pierwsza surowica krótko po zakażeniu, druga surowica po 14 dniach) może być pomocne przy interpretacji w przypadku niejasnych rozpoznań.

8.4 Schemat oceny IgG, IgM i IgA

Wynik (VE)	Ocena	Interpretacja
< 9,0	negatywne	Przeciwciała bez znaczącego stężenia
9,0 - 11,0	wartości graniczne	Stężenie przeciwciał nie jest znacząco podwyższone Powtórzyć test, ewentualnie zażądać 2 próbki surowicy
> 11,0	pozytywne	Stężenie przeciwciał znacząco podwyższone - wskazanie świeżego zakażenia - wskazanie niedawno przebytego zakażenia - przeciwciała poszczepienne

8.5 Ograniczenia testu

- Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
- Do oceny testów ELISA Grypa nie było dostępnych surowic pacjentów ze świeżymi zakażeniami grypowymi. Dane dotyczące działania opierają się w związku z tym na badaniach surowic poszczepiennych i surowic krwiodawców.
- Możliwe jest wystąpienie reaktywności krzyżowych pomiędzy Grypą typu A a Grypą typu B.
- Instytut RKI zaleca, że w przypadku utrzymywania się podejrzenia klinicznego należy bezzwłocznie powtórzyć negatywny wynik diagnostyki laboratoryjnej.
- Użycie aktualnych rekombinowanych antygenów HA nie zmieniło danych dotyczących wydajności. Możliwe jest, że stosowanie tych antygenów może prowadzić do poprawy diagnostyki w niektórych surowicach.

9. Literatura

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

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

▼ **Rozcieńczenie próbki IgG/IgA w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczania
(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

▼ **Rozcieńczenie próbki IgM w stosunku 1:101**
Adsorpcja czynnika reumatoidalnego za pomocą RF-SorboTech

np.:

5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +
1 kroplę RF SorboTech inkubować przez 15 min w temp.
pok.

Wykonanie badania

Inkubacja próbek



4x płukanie



Inkubacja
koniugatu



4x płukanie



Inkubacja substratu



Zatrzymanie



Pomiar ekstynkcji

**30 minut w temperaturze
37°C.**

**30 minut w temperaturze
37°C.**

**30 minut w temperaturze
37°C.**

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i
kontrola

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl koniugatu

IgG, IgM, IgA

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

100 µl substratu

**50 µl roztworu do
zatrzymania reakcji**

ostrożnie wstrząsnąć

**Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-
690nm)**