

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

Rendelési szám: EC118.00

VIROTECH Influenza A IgA ELISA
(Influenza A IgA ELISA)

Rendelési szám: EC118A00

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

Rendelési szám: EC119.00

VIROTECH Influenza B IgA ELISA
(Influenza B IgA ELISA)

Rendelési szám: EC119A00

Színkód:	Influenza A:	IgG/IgM:	világoskék
		IgA:	világoskék / fekete
	Influenza B:	IgG/IgM:	világoskék / átlátszó
		IgA:	világoskék / piros

CSAK *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

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



Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A készlet tartalma.....	3
3.1 IgG / IgM teszt készlet.....	3
3.2 IgA teszt készlet.....	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése	4
7.1 Vizsgálati anyag.....	4
7.2 A reagensek előkészítése	5
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése.....	5
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése.....	6
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése.....	6
8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása.....	6
8.3 Az eredmények interpretációja.....	6
8.4 IgG, IgM és IgA kiértékelési táblázat	6
8.5 A teszt határai	7
9. Irodalom	7
10. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	8

1. Alkalmazás célja

Az influenza ELISA-k a humán influenza A, illetve influenza B vírus antitestjeinek szérumban való kimutatására szolgálnak. Vakcinációból származó antitestek, illetve friss fertőzés kimutatására natív nukleáris antigénnel valamint rekombináns hemagglutinin (HA). A rekombináns hemagglutinin évente aktualizálják (Influenza A: A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1) -like vírus, A/Hawaii/70/2019/ (H1N1)-like vírus; Influenza B: B/Washington/02/2019-like vírus).

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A készlet tartalma

3.1 IgG / IgM teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (liofilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgG negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgG kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgG pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgM negatív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
8. **IgM kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
9. **IgM pozitív kontroll, 1300 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
10. **IgG-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
11. **IgM-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
12. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'TMB), 11ml**, felhasználásra kész
13. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

3.2 IgA teszt készlet

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető reakciómélyedésből áll. Liofilizált.
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgA negatív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgA kimutatási határérték (cut-off) kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgA pozitív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgA-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerekkel, Tris pufferben, felhasználásra kész
8. **Tetrametil-benzidin – szubsztrátoldat (3,3',5,5'TMB), 11ml**, felhasználásra kész
9. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeverék

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reagenseket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.
3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószertasakkal)	3 hónap
Reumafaktor – abszorbens	Hígítatlan, felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Véghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét

5. Óvintézkedések és biztonsági előírások

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
2. A tartósítószer tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Desztillált / ioncserélt víz
2. Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
3. Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
4. Vegyszerüvegek
5. Papírkendők és itatóspapír
6. Fedő az ELISA lemezekhez
7. Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
8. ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
9. Spektrofotométer ELISA lemezekhez , hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
10. Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által előírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

1. Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.

2. Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőzött mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azáltal, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. A felhasználásra kész kontrollok (pozitív kontroll, kimutatási határérték (cut-off) kontroll, negatív kontroll) paraméterfüggetlen és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).
5. A specifikus IgM-antitestek kimutatását zavarhatja a túl magas IgG-titer illetve reumafaktorok jelenléte, hamis pozitív illetve negatív eredményekhez vezetve. A **szérumokat elő kell kezelni RF-SorboTech** (VIROTECH-adszorpciósszer) készítménnyel. IgM kontrollok esetében az előabszorpció lépés kimarad.

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Pipetázzon ki tesztenként 100 µl felhasználásra kész hígítópuffert (vak minta), negatív, határérték (cut-off) és pozitív IgG-, IgM- és IgA kontrollt, valamint a hígított betegszérumokat. Minden esetben (vak, kontrollok, betegszérumok) javasoljuk hogy két párhuzamos mérést végezzen; a határérték (cut-off) kontrollok esetében a két mérés elvégzése feltétlenül szükséges. Munkahígítás betegszérumok esetében: 1+100; pl. 10 µl szérum + 1 ml hígítópuffer.
2. A reagensek kipipetázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyjon a lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipetázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3.pont).
7. Pipetázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipetázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárás mód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A felhasználásra kész kontrollok a specifikus IgG-, IgA- és IgM-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitatív meghatározására szolgálnak. A teszt végrehajtása során előforduló ingadozásokat a számítási módszer kiegyenlíti, ezáltal nagyfokú reprodukálhatóságot érve el. A VE kiszámításához az OD-értékek átlagát kell használni.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

a) OD-értékek

Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.

A negatív kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek alatt, míg a pozitív kontrollok és a cut-off kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell lenniük.

b) VIROTECH egységek (VE)

A cut-off kontrollok VIROTECH egységekben (VE) megadott értéke 10 VE-ben van meghatározva. A pozitív kontrollok VE-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott értéktartományon belül kell lenniük.

Amennyiben a fenti feltételek (OD-értékek, VE értékek) nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása

A vak minta extinkcióját (450/620 nm) minden extinkcióból ki kell vonni.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{pozitív kontrollok})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{pozitív kontroll})}}{\text{OD}_{(\text{cut-off kontroll})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{betegszérum})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{betegszérum})}}{\text{OD}_{(\text{cut-off kontroll})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Az eredmények interpretációja

Influenza esetén az IgG antitestek a fertőzés után 2-3 héttel jelennek meg (2). Pozitív eredmény akut vagy a közelmúltban lezajlott fertőzésre utalhat (kérjük az oltási előzményeket figyelembe venni!). Ebben az esetben ezeket az eredményeket mindig csak további diagnoszelemként kell értékelni, a teljes leleten belül. Megbízható diagnózist ezért csak az anamnézis, a klinikai és laboreredmények figyelembevételével lehet felállítani. A megnövekedett IgA- és IgM-titer friss fertőzésre utaló további utalásként értékelhető. Újrafertőzés esetén is bekövetkezhet titerük emelkedése és a fokozott szint akár egy évig is fennmaradhat.

Az influenza diagnózis megbízhatósága szempontjából előnyös követni az Ig-osztályok titerváltozásait. A titer lefutásának vizsgálata (első szérum vizsgálata röviddel a fertőzés után, második szérum 14 nappal később) nem egyértelmű diagnózis esetén segítséget jelenthet az eredmények interpretációjában.

8.4 IgG, IgM és IgA kiértékelési táblázat

Eredmény (VE)	Kiértékelés	Interpretáció
< 9,0	negatív	Nincs szignifikáns antitestkoncentráció
9,0 - 11,0	határérték	Az antitestkoncentráció nem emelkedett meg szignifikáns mértékben Tesztet megismételni, adott esetben második szérummintát venni
> 11,0	pozitív	Szignifikánsan megemelkedett antitestkoncentráció - Friss fertőzésre utaló jel - Egy, már lezajlott fertőzésre utaló jel - Oltási antitestek

8.5 A teszt határai

1. A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
2. Az influenza ELISA teszt értékeléséhez nem állnak rendelkezésre akut influenza-fertőzésben szenvedő betegektől származó szérumok. A módszer tesztelése ezért oltóanyagokon és véradóktól származó szérumokon alapult.
3. Az influenza A és influenza B között keresztreakciók léphetnek fel.
4. Az RKI javasolja a negatív labordiagnosztikai eredmény rövid időn belüli megismétlését klinikai gyanú fennállása esetén.
5. A jelenlegi rekombináns HA antigének használata nem változtatta meg a teljesítményadatokat. Lehetséges, hogy ezen antigének alkalmazása javítja egyes szérumok diagnózisát

9. Irodalom

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

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

▼ **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

▼ **IgG-/IgA- minták – hígítás**
1:101

pl.:
10 µl szérum/plazma + 1000 µl hígítópuffer.
(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

▼ **IgM- minták – hígítás**
1:101

Reumafaktor-abszorpció RF-SorboTech-hel

pl.:
5 µl szérum/plazma + 450 µl hígítópuffer +
1 csepp RF-SorboTech, 15 perc inkubáció
szobahőmérsékleten

A vizsgálat elvégzése

Mintainkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl betegszérum

Üres minta (hígítópuffer) és kontrollok



4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni



Konjugátum inkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl konjugátum

IgG, IgM, IgA



4x mosás

400 µl mosóoldat

jól kiütögetni



Szubsztrátinkubáció

30 perc 37°C-on

100 µl szubsztrát



Leállítás

50 µl fixáló (stop) oldat

óvatosan kevertetni



Extinkció mérés

Fotométer 450/620 nm-en
(referenciahullám hossza 620-690nm)