

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

Obj. č.: EC118.00

VIROTECH Influenza A IgA ELISA
(Influenza A IgA ELISA)

Obj. č.: EC118A00

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

Obj. č.: EC119.00

VIROTECH Influenza B IgA ELISA
(Influenza B IgA ELISA)

Obj. č.: EC119A00

Farebné kódovanie: Influenza A:	IgG/IgM:	svetlomodré
	IgA:	svetlomodré / čierne
Influenza B:	IgG/IgM:	svetlomodré / priezračné
	IgA:	svetlomodré / červené

POUŽÍVAŤ LEN PRE DIAGNOSTIKU 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



Obsah

1. Účel použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia.....	3
3.1 Testovacia súprava IgG/IgM	3
3.1 Testovacia súprava IgA.....	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.....	4
7.1 Vyšetrovaný materiál.....	5
7.2 Príprava reagensí.....	5
7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Použitie procesorov ELISA.....	5
8. Vyhodnotenie testu.....	6
8.1 Kontrola fungovania testu.....	6
8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....	6
8.3 Interpretácia výsledkov	6
8.4 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA	7
8.5 Hranice testu.....	7
9. Literatúra.....	7
10. Schéma priebehu testu	8

1. Účel použitia

Influenza ELISA slúžia na preukázanie ľudských protilátok proti vírom Influenza A resp. Influenza B v sére. Na potvrdenie výskytu štiepiacich sa choroboplodných zárodkov a čerstvých infekcií sa používajú prírodné jadrové antigény, ako aj rekombinované hemagglutíníny (HA). Rekombinované hemagglutíníny sa v zoznamoch aktualizujú každý rok (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. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunitný komplex. Nenaviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. 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.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgG/IgM

1. **1 mikrotitračná doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
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 (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a s Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgM negatívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
8. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
9. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
10. **IgG konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčích alebo kozích) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
11. **IgM konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčích alebo kozích) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teliacim sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, pripravený na použitie
12. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
13. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

3.1 Testovacia súprava IgA

1. **1 mikrotitračná doska**, pozostávajúca z 96 jednotlivých odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom
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 (antihumánny), 11 ml**, (ovčích alebo kozích) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teliacim sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris-pufrí, pripravený na použitie

8. Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11 ml, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu**, 6 ml, obsahuje zmes kyselín. Skladovanie a trvanlivosť testovacích súprav a reagensí pripravených na použitie

4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie

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

1. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
2. Konjugát pripravený na použitie 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 použitie, 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
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitračná platnička	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 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (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 použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitračné prúžky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť tečúcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanálová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky
5. Rúšok z buničiny
6. Kryt platničiek 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. Vykonanie testu

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

7.1 Vyšetrovaný materiál

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

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy čerstvé.

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

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

7.2 Príprava reagensí

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

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagensie zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími prúžkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštálky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potraсте).
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 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

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 dvojtitú sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojtitá 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 buničinový podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
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 nepremiešajú 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 slepeho pokusu sa odpočítala 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 nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. väčších opravách vášho procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúšanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrt' roka.
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 zabezpečuje bezchybnú funkciu vášho procesoru ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Vyhodnotenie testu

Kontrolné roztoky pripravené na použitie slúžia k semikvantitatívnemu stanoveniu špecifických protilátok IgG, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). 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

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. Vypočítané 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 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií.

$$\text{VE (pozit. kontr. roztok)} = \frac{\text{OD (pozitívny kontr. roztok)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

$$\text{VE (sérum pacienta)} = \frac{\text{OD (pacientovo sérum)}}{\text{OD (kontr. roztok cut-off)}} \times 10$$

8.3 Interpretácia výsledkov

IgG protilátky sa objavajú pri chrípke približne 2-3 týždne po infekcii. (2) V dôsledku toho môže pozitívny výsledok poukázvať na akútnu alebo nedávno prekonanú infekciu (dodržiavať manažment očkovania!) Pritom však je nutné považovať tieto výsledky vždy len ako ďalšiu súčiastku diagnostickej stavebnice v rámci celkového nálezu. Konečná diagnóza je v dôsledku toho možná len so začlenením anamnézy, klinického obrazu a laboratórnych údajov. Výskyt zvýšeného titru IgA a IgM môže byť doplnujúce upozornenie na čerstvú infekciu. Vyskytujú sa aj pri reinfekciách a môžu perzistovať až jeden rok.

Na to, aby sa podarilo diagnostiku chrípky stvárniť bezpečnejšie, je výhodné rozpoznať pohyby titru v triedach Ig. Vyšetrenie priebehu titrov (prvotné sérum krátko po infekcii, druhé sérum 14 dní neskôr) môže v prípade nejasných diagnóz poslúžiť ako interpretačná pomôcka.

8.4 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA

Výsledok (VE)	Posúdenie	Interpretácia
< 9,0	negatívne	Protilátky bez signifikantnej koncentrácie
9,0 - 11,0	medzná hodnota	Žiadna signifikantne zvýšená koncentrácia protilátok Testovanie prípadne zopakovať 2 Vyžiadať vzorku séra
> 11,0	pozitívne	Signifikantne zvýšená koncentrácia protilátok • Poukazuje na akútnu infekciu • Poukazuje na prekonanú infekciu • Protilátky po očkovaní

8.5 Hranice testu

1. Interpretácia sérologických výsledkov musí vždy zohľadniť klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne výsledky, ktoré sú k dispozícii.
2. Pri vyhodnotení testov ELISA chrípky neboli k dispozícii žiadne séra pacientov s akútnou infekciou chrípky. Preto sa údaje o výkonnosti opierajú o testovanie očkovacích sér a sér darcov krvi.
3. Medzi chrípkou A a chrípkou B sa môžu objaviť krížové reaktivity.
4. RKI (Robert Koch Insitut = Ústav Róberta Kocha) odporúča, aby sa pri pretrvávajúcom klinickom podozrení negatívny laboratórne diagnostický výsledok v krátkej dobe zopakoval.
5. Použitie súčasných rekombinantných HA antigénov nezmenilo údaje o výkonnosti. Je možné, že použitie týchto antigénov vedie k zlepšeniu diagnostiky niektorých sér.

9. Literatúra

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 2019-2020 northern hemisphere influenza season; World Health Organization; March 2019

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

▼ **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

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

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

▼ **Vzorky IgM – Zriedenie**
1:101

Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech

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

Vykonanie testu

Inkubácia vzoriek

30 minút pri 37 °C

100 µl vzorky pacientov

Slepý pokus (riediaci pufer) a kontrolné roztoky

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia konjugátu

30 minút pri 37 °C

100 µl konjugátu

IgG, IgM, IgA

4 x prepláchnuť

400 µl premývacieho roztoku

dobré vyklepať

Inkubácia substrátu

30 minút pri 37 °C

100 µl substrátu

Zastaviť

50 µl zastavovacieho roztoku

opatrne potriať

Odmerať extinkciu

Fotometer pri 450/620 nm
(referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)