

**VIROTECH Adenovirus IgG/IgM ELISA
(Adenovirus IgG/IgM ELISA)**

objednací číslo : EC121.00

Adenovirus IgA-Set

objednací číslo : EC121.08

barevné kódování : tmavomodrá / průhledná

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

**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 15 / VIROTECH Adenovirus IgG/IgM/IgA ELISA CZ

Obsah

1. Účel použití.....	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy	3
3.1 IgG/IgM souprava.....	3
3.2 IgA souprava.....	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití.....	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....	4
7. Testování	4
7.1 Testovaný materiál	4
7.2 Příprava reagensů	4
7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....	5
7.4 Použití analyzátoru ELISA	5
8. Vyhodnocení testu	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	6
8.3 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA.....	6
8.4 Limity testu.....	6
9. Literatura	6
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....	8

1. Účel použití

Tento přípravek ELISA slouží ke kvalitativnímu a semikvantitativnímu prokázání protilátek IgG, IgM a IgA proti adenovirům v lidském séru.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

3. Obsah soupravy

3.1 IgG/IgM souprava

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **Ředící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgG negativní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgM negativní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
8. **IgM hraniční kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
9. **IgM pozitivní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
10. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovčí nebo ostrucha kšólová) -kšén-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
11. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšólová) s kšénovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS = fetální telecí sérum)
12. **Substrátový roztok tetrametylbenzidín (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

3.2 IgA souprava

1. **IgA negativní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
2. **IgA hraniční kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
3. **IgA pozitivní kontrola, 1300μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
4. **IgA- konjugát (anti-human), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha kšólová) s kšénovou peroxidázou s FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné, (FCS = fetální telecí sérum)

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensů je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Lidská ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v souhlasně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce

revmatoidní faktor - absorbent	neželžený, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	želžený	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po želžení (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Pěsto by měly být všechny vzorky, želžené vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciální infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50μl, 100μl
3. Mikropipety: 10μl, 100μl, 1000μl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buničiny
6. Víška na destiláty ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývací ELISA mikrotitrační destičky
9. Mikrofotometr na mikrotitrační destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního postupu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Želžené pacienty používejte vždy i první.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Používejte pouze i první, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falesně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysokou stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k želžení a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny barvy a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně barvy destiček uvedené v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda byla tato teplota dosažena.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechny i inidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.

4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepjte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou naružit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpci ní prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá potřebná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100μl zředěného pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgG, IgM a IgA, a naředěných sér pacienta. Doporučíme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředěný sérum pacienta : 1+100; např. 10μl sérum + 1ml zředěného pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destilka se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí 3x promývacím roztokem 350 - 400μl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100μl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje 3x násobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100μl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50μl. Destilku opatrně a pevně protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně zbarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl odevšad od absorbancí kontrol a vzorků. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

7.4 Použití analyzátoru ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesoru ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístroje.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístroje, resp. při opravách vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přikontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přikontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

8. Vyhodnocení testu

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG, IgA a IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

8.1 Kontrola funkcí nosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Výpočetné VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\text{VE pozitivní kontrola} = \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{hraniční}} \times 10$$

$$\text{VE vzorek} = \frac{\text{OD vzorek}}{\text{hraniční}} \times 10$$

8.3 Schéma vyhodnocení IgG, IgM a IgA

Výsledek (VE)	Posouzení
< 9,0	negativní
9,0 - 11,0	hraniční hodnoty
> 11,0	pozitivní

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovat testovat z nového odběru. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací válce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
- Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.
- Pozitivní výsledek IgG svědčí buď o infekci prodělané před delší dobou nebo o 1. etapě infekce. Pozitivní výsledek IgM svědčí o akutní infekci a pozitivní výsledek IgA svědčí o relativně akutní reinfekci, protože IgA může celé měsíce persistovat. Negativní výsledek svědčí o tom, že pacient nebyl, popřípadě není infikován.

8.4 Limity testu

- Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
- Dvojítá anti-grubovice (α -dsDNA) sér (ANA, systemický Lupus erythematosus) vykazuje s přípravkem VIROTECH Diagnostics Adenovirus ELISA křížovou reakci.
- Je třeba dbát na to, že :
křížovou reakci s jiným bacilem nebo s mimořádně vysoce koncentrovanými složkami séra je ve výjimečných případech možné, že test povede k nesprávně pozitivním výsledkům. U nerespondujících, imunosuprimovaných pacientů nebo v případě příliš silného odběru může docházet k nesprávně negativním výsledkům

9. Literatura

- Thomas Porstmann (Hrsg.), Virusdiagnostik, Diagnostische Bibliothek Band 1, Blackwell Wissenschaft 1996, S. 104

2. http://virologie.medizin.uni-essen.de/html/analysen/ana_adeno.htm erstellt von Dr. R. Scheidhauer, letzte Änderung: 21.05.2002
3. <http://www.vu-wien.ac.at/i123/SPEZVIR/ADENOGEN1.HTML> (Veterinärmedizinisches Institut der Universität Wien), Stand Juni 2003
4. Thomas Porstmann (Hrsg.), Virusdiagnostik, Diagnostische Bibliothek Band 1, Blackwell Wissenschaft 1996, S. 113
5. Brandis, Köhler, Eggers, Pulverer, Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie, 7. Auflage, Fischer 1994, S.839
6. Mikrobiologische Diagnostik und Krankenhaushygiene, MVP, 2. Ausgabe, Stand Jan 2003, S. 48 und 64

Příprava vzorků a promývacího roztoku

Σ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

Σ **zředění Vzorky IgG/IgA**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

Σ **zředění Vzorky IgM**
1:101

**adsorpce revmatoidního faktoru pomocí
RF-SorboTech**

např.:

5 µl séra/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +
1 kapka RF- SorboTech, inkubace při pokojové teplotě
po dobu 15 minut

Schéma testu

