

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

**Obj. | .: EC121.00**

**Adenovirus IgA-Set**

**Obj. | .: EC121.08**

**Farebné kódovanie: tmavomodré/priezračné**

**POUŽÍVAŠ LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO**

**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 3 / VIROTECH Adenovirus IgG/IgM/IgA ELISA SK

# Obsah

|                                                                                                 |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Účel použitia.....</b>                                                                    | <b>3</b> |
| <b>2. Princíp testu .....</b>                                                                   | <b>3</b> |
| <b>3. Obsah balenia.....</b>                                                                    | <b>3</b> |
| 3.1 Testovacia súprava IgG/IgM .....                                                            | 3        |
| 3.2 Súprava na stanovenie IgA .....                                                             | 3        |
| <b>4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie.....</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia.....</b>                                             | <b>4</b> |
| <b>6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky).....</b>                                 | <b>4</b> |
| <b>7. Vykonanie testu.....</b>                                                                  | <b>4</b> |
| 7.1 Vyčistený materiál .....                                                                    | 4        |
| 7.2 Príprava reagensí .....                                                                     | 5        |
| 7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA .....                                                        | 5        |
| 7.4 Použitie procesorov ELISA .....                                                             | 5        |
| <b>8. Vyhodnotenie testu .....</b>                                                              | <b>6</b> |
| 8.1 Kontrola fungovania testu .....                                                             | 6        |
| 8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....                                                        | 6        |
| 8.3 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA .....                                                    | 6        |
| 8.4 Hranice testu.....                                                                          | 7        |
| <b>9. Literatúra .....</b>                                                                      | <b>7</b> |
| <b>10. Schéma priebehu testu .....</b>                                                          | <b>8</b> |

## 1. Účel použitia

---

ELISA adenovírus je určený na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie protilátok IgG, IgM a IgA proti adenovírusom v ľudskom sére.

## 2. Princíp testu

---

Protilátka prítomná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitraľnej doske imunitný komplex. Neneviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neneviazané 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 mikrotitraľná doska** pozostávajúca z 96 odľomiteľných 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. **premyvacia roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a 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**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
11. **IgM konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teľacím 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

### 3.2 Súprava na stanovenie IgA

1. **IgA negatívny kontrolný roztok, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
2. **IgA kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
3. **IgA pozitívny kontrolný roztok, 1300 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
4. **IgA konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) konjugát chrenovej peroxidázy s FCS a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, pripravený 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 pohlcovačom 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   |
| Mikrotitraľná platňa     | 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 vziať vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitraľné príručky 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 úcou 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. Rúčky z buniťiny
6. Kryt platní ELISA
7. Odpadový kontajner pre infekčný materiál
8. Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitraľných platní
9. Spektrofotometer pre mikrotitraľné 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 Vyšetřovaný materiál

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

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia používať vždy prvé.

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

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

## 7.2 Príprava reagensií

Diagnostický systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje použiť Sriediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a garže. Kontrolné roztoky pripravené na použitie (pozitívne kontrolné séra s hodnotou odstihnutia - cut-off, negatívne kontrolné séra) sa musia použiť podľa špecifických parametrov a výhradne s platňou, ktorej garža 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, a potom otvorte balenie s testovacími prúčkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potrasť.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštáliky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potrasť).
5. Vysoké IgG titre alebo reumatické faktory môžu rušiť špecifický dôkaz protilátok IgM a viesť k nesprávnemu pozitívnemu alebo negatívnemu výsledkom. **Pre správne stanovenie IgM je preto nutné séra vopred ošetriť prípravkom RF SorboTech** (adsorbentný prostriedok firmy VIROTECH). Pri kontrolných sérach IgM táto predadsorpcia odpadá.

## 7.3 Vykonalenie 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 dvojité sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá 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 vyklapaním na buniťinovú 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 potrasť, až kým sa tekutiny celkom nepremieňajú a kým nie je vidieť šedé sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpútala 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 váhového 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 preskúvanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrtšroka.
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 zabezpečí uje bezchybnú funkciu váhového procesora 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. Výpočítané 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 odpovíadať všetkým extinkciám.

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

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

### 8.3 Schéma vyhodnotenia IgG, IgM a IgA

| Výsledok (VE) | Posúdenie      |
|---------------|----------------|
| < 9,0         | negatívne      |
| 9,0 - 11,0    | medzná hodnota |
| > 11,0        | pozitívne      |

- Ak namerané VE vzorky ležia nad medznou oblasťou, tak sa tieto vzorky považujú za pozitívne.
- Ak sa namerané hodnoty VE nachádzajú v rámci uvedeného medzného rozpätia, nezistila sa žiadna signifikantne vysoká koncentrácia protilátok, teda vzorky sa považujú za medzné. Pre spoľahlivý dôkaz infekcie je potrebné stanoviť obsah protilátok dvoch vzoriek séra. Jedna vzorka séra by sa mala otestovať priamo po vypuknutí infekcie, druhá vzorka o 5-10 dní neskôr (rekonvalescentné sérum). Koncentrácia protilátok oboch vzoriek sa musí určiť špeciálne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť špecifickú diagnózu.
- Ak namerané hodnoty ležia pod definovaným medzným rozpätím, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné antigénovo-špecifické protilátky. Vzorky sa považujú za negatívne.
- Pozitívny výsledok stanovenia IgG vypovedá buď o infekcii, ktorú pacient prekonal pred dlhšou dobou, alebo o prvej infekcii.  
Pozitívny výsledok IgM indikuje akútnu infekciu a pozitívny výsledok IgA indikuje relatívne akútnu reinfekciu, lebo IgA dokáže perzistovať niekoľko mesiacov.  
Negatívny výsledok hovorí o tom, že pacient nebol, resp. nie je infikovaný.

#### 8.4 Hranice testu

1. Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brašreŤna klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne Nalgie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.
2. Séra s antiparalelným dvojitém rešazcom DNA (Ť-drDNA) (ANA, systémový Lupus erythematosus) vykazujú krígovú reaktivitu s Adenovirus Elisa VIROTECH Diagnostics.
3. Je nutné brašdo úvahy:  
Krígovou reaktivitou s iným pôvodcom nákazy alebo s mimoriadne vysokými zločkami séra môže dôjsŠk výnimol nej situácii, ě test nesprávne ukáže pozitívne výsledky.  
U imunosuprimovaných pacientov - non-responderov alebo pri privĹ asnom odbere sa môžu vyskytnúŠnesprávne negatívne výsledky.

#### 9. Literatúra

---

1. 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](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

## Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

Σ **Premývací roztok:** Koncentrát doplníŠna 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

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

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

Σ **Vzorky IgM ĩ Zriedenie**  
**1:101**

**Adsorpcia reumatického faktora pomocou prípravku RF SorboTech**

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

## Vykonanie testu

