eurofins | Immunolab

Návod k použití

Adenovirus IgG ELISA

ELISA test
pro detekci a kvantifikaci lidských protilátek IgG proti **adenoviru**
v lidském séru nebo plazmě

CE

Kat. č.: **ILE-ADV01**
Skladování: +2 °C až +8 °C
Pouze pro diagnostické použití in-vitro

Únor 2019

IMMUNOLAB GmbH, Otto-Hahn-Str. 16, D-34123 Kassel
Tel: +561 491742-0, Fax: +561 491742-20, e-mail: info@immunolab.de

OBSAH

1 Informace o výrobku 4

2 Úvod 4

3 Princip testu 4

4 Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny 5

5 Složení soupravy 6

6 Další potřebné vybavení k provedení testu 7

7 Odběr a skladování vzorků 8

8 Pracovní postup 8

9 Hodnocení výsledků 9

10 Charakteristika soupravy 11

11 Literatura 12

Symboly

CAL	Kalibrátor
CONJ	Konjugát
CONC	Koncentrát
SAMP DIL	Ředicí roztok vzorků
STOP	Zastavovací roztok
SUBS	Substrát
MT PLATE	Mikrotitrační destička
WASH BUF	Promývací roztok

1 Informace o výrobku

IMMUNOLAB Adenovirus IgG je ELISA souprava pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG proti adenoviru v lidském séru nebo plazmě. k dostání jsou i další varianty testu určené pro jiné tělní tekutiny a lze si je vyžádat u Technického servisu společnosti IMMUNOLAB.

Sérologický nález je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

2 Úvod

Adenoviry jsou lidské a zvířecí patogeny, charakteristické svojí lokalizací uvnitř buněčného jádra, výraznou stabilitou vůči vlivům vnějšího prostředí a společnými komplement fixačními antigeny. Onemocnění způsobená adenoviry jsou celoročně se vyskytující ve všech populacích. Infekce se šíří buď kapénkovým přenosem, nebo fekálně orální cestou. Inkubační doba se pohybuje od 5 do 7 dnů. Viry napadají převážně sliznice dýchacího a trávicího traktu, ale také oční rohovku. Jsou akumulovány v epiteliálních buňkách a regionálních lymfatických uzlinách. Z respiračních virů vyvolávají právě adenoviry nejrozmanitější škálu onemocnění dýchacích cest. Adenovirová infekce je nejčastější virové onemocnění dýchacího traktu u dětí předškolního věku (sérotypy 1 až 5 a 7). Převážně se jedná o akutní onemocnění horních cest dýchacích. Nejzávažnější formou adenovirové respirační infekce je pneumonie, vyskytující se především u malých dětí mladších jednoho roku.

V letním období vyvolávají faryngokonjunktivilní horečky, kdy rezervoár virů je situován ve vodě plaveckých bazénů, a epidemie keratokonjunktivitidy jak u dětí, tak i u dospělých.

Střevní forma adenovirové infekce se převážně objevuje u dětí mladších jednoho roku.

Akutní infekci lze detekovat pomocí izolace viru nebo sérologicky. Sérologické testy jsou zvláště důležité, neboť u pacienta prokazují akutní fázi infekce a mohou se použít při rozsáhlých epidemiologických šetřeních. Testy KFR a ELISA detekují převážně protilátky namířené proti rodově specifickým determinantám na hexonové komponentě kapsidy. Doporučené testy pro detekci specifických protilátek jednotlivých sérotypů jsou hemaglutinačně inhibiční test a virus neutralizační test. Specifické antigenní determinanty jednotlivých sérotypů adenovirů jsou lokalizovány na vláknech kapsidy. Vzhledem k všudypřítomnosti adenovirů a četným zkříženým reakcím mezi příbuznými sérotypy, je k průkazu infekce nutná sérokonverze s nejméně čtyřnásobným zvýšením titru protilátek. v sérologických testech jsou převážně detekovány protilátky třídy IgG.

3 Princip testu

Souprava IMMUNOLAB Adenovirus IgG je založena na principu ELISA, typ sandwich. Antigen adenoviru je navázán na povrchu mikrotitračních jamek. Naředěný vzorek pacienta nebo připravené standardy se pipetují do jamek mikrotitrační destičky. Vzniká vazba mezi IgG protilátkami séra a imobilizovaným antigenem adenoviru v jamce mikrotitrační destičky. Po jedné hodině inkubace při laboratorní teplotě je destička promyta zředěným promývacím roztokem, čímž se odstraní nenavázaný materiál. Následně se přidá připravený peroxidázový konjugát s obsahem protilátek proti lidskému IgG a inkubuje se 30 minut. Po dalším promytí je pipetován substrát (TMB) a inkubuje se 20 minut, čímž se v jamkách vytvoří modré zbarvení. Vývoj zabarvení se ukončí přidáním zastavovacího roztoku, po němž se barva změní z modré ve žlutou. Výsledné zbarvení se změří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Koncentrace IgG protilátek je přímo úměrná intenzitě zbarvení.

4 Omezení, bezpečnostní opatření a všeobecné pokyny

- Pouze pro použití in vitro! Nepožívejte ani nepolykejte! Je nutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce, zákaz jídla, pití a kouření v laboratoři.
- Všechna séra, plazmy a pufry byly testovány všeobecně uznávanými metodami na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV a jsou negativní. Přesto je nutné respektovat preventivní opatření, např. používat latexové rukavice.
- Rozlitý vzorek a reagencie je třeba setřít za použití dezinfekčního roztoku (např. 5% chlornanu sodného) a náležitě zneškodnit.
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na laboratorní teplotu (+18 °C až +25 °C).
- Před pipetováním by se všechny reagencie měly důkladně promíchat šetrným nakláněním nebo kýváním lahvičky. Vyhněte se dynamickému třepání, které vede k tvorbě pěny.
- Je důležité pipetovat reagencie ve stejných intervalech, aby ve všech jamkách mikrotitrační destičky byly zajištěny stejné podmínky testu.
- Při dávkování reagencií z lahviček se ujistěte, že nedošlo ke kontaminaci uzávěru. Vyvarujte se možného vzájemného smíchání reagencií. Obsah lahviček je často citlivý vůči oxidaci, proto se musí otevírat pouze na omezenou dobu.
- Aby nedošlo k přenosu nebo křížové kontaminaci, je nutné používat čisté jednorázové špičky na pipety.
- Všechny reagencie se musí spotřebovat do data jejich exspirace.
- V souladu se správnou laboratorní praxí (SLP) a normou ISO 9001 by měly být veškeré používané laboratorní přístroje pravidelně kontrolovány z hlediska jejich přesnosti a spolehlivosti. To se týká především mikrotitračních pipet, promývacích a odečítacích zařízení (ELISA Reader).
- Je nutné zabránit kontaktu některých reagencií, především Zastavovacího roztoku a Substrátu, s kůží, očima a sliznicemi, neboť může dojít k jejich podráždění nebo poleptání a hrozí zde riziko intoxikace.

5 Složení soupravy

Mikrotitrační destička potažená antigenem adenoviru	1 × 12 stripů
Kalibrátor A (Negativní kontrola)	1 × 2 ml
Kalibrátor B (CUT-OFF standard)	1 × 2 ml
Kalibrátor C (Slabě pozitivní kontrola)	1 × 2 ml
Kalibrátor D (Pozitivní kontrola)	1 × 2 ml
Konjugát	1 × 15 ml
Substrátový roztok (TMB)	1 × 15 ml
Zastavovací roztok	1 × 15 ml
Ředicí roztok vzorků	1 × 60 ml
Promývací roztok (10krát koncentrovaný roztok)	1 × 60 ml
Plastové fólie	2 ks
Plastový sáček	1 ks

Skladování a stabilita (viz data exspirace na štítku krabičky)

Součásti soupravy uchovávejte při teplotě +2 °C až +8 °C. Po použití je nutné destičku opět zabalit, uzávěry lahviček těsně uzavřít a soupravu uchovávat při teplotě +2 °C až +8 °C. Po otevření je možno soupravu používat tři měsíce.

Univerzální reagencie

Promývací roztok, Substrát (TMB) a Zastavovací roztok jsou stejné ve všech testovacích soupravách pro diagnostiku infekčních nemocnění od společnosti IMMUNOLAB, kde je jako detekční enzym použita peroxidáza. Jsou tedy mezi jednotlivými výrobky a šaržemi zaměnitelné. Všechny ostatní reagencie přísluší ke konkrétní soupravě a šarži a zaměnitelné nejsou!

Mikrotitrační destička

12 stripů, každý s 8 odlamovacími jamkami potaženými antigenem adenoviru (adenovirus hexon). Připravené k použití.

Kalibrátor A (Negativní kontrola)

2 ml, proteinový roztok ředěný PBS, neobsahující specifické IgG protilátky proti adenoviru. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Kalibrátor B (CUT-OFF standard)

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující nízkou koncentraci specifických IgG protilátek proti adenoviru. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Kalibrátor C (Slabě pozitivní kontrola)

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující střední koncentraci specifických IgG protilátek proti adenoviru. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Kalibrátor D (Pozitivní kontrola)

2 ml, lidské sérum ředěné PBS, obsahující vysokou koncentraci specifických IgG protilátek proti adenoviru. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu a 0,01 % bromnitrodioxanu. Roztok v pracovním ředění.

Konjugát

15 ml, roztok obsahující králičí imunoglobulin proti lidskému IgG značený křenovou peroxidázou. Roztok obsahuje 0,01 % methylisothiazolonu, 0,01 % bromnitrodioxanu a 5 mg/l Proclinu™. Roztok v pracovním ředění.

Substrát (TMB)

15 ml, Jednosložkový substrátový roztok TMB (tetramethylbenzidin). Roztok v pracovním ředění.

Zastavovací roztok

15 ml, 0,5 M roztok kyseliny sírové. Roztok v pracovním ředění.

Ředicí roztok vzorků

60 ml, Pufr PBS se stabilizátory bílkovin (BSA). Roztok obsahuje 0,095 % azidu sodného. Roztok v pracovním ředění.

Promývací roztok

60 ml, 10krát koncentrovaný roztok PBS a Tween 20. Pracovní koncentrace: řeďte koncentrovaný Promývací roztok v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát zahřejte na 37°C po dobu 15 minut.

Plastové fólie

2 kusy na překrytí mikrotitračních stripů během inkubace.

Plastový sáček

Opakovaně uzavíratelný obal pro skladování nepoužitých stripů mikrotitrační destičky v suchu.

6 Další potřebné vybavení k provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety pro přesné dávkování objemu 5 µl, 100 µl a 500 µl

Špičky pro jednorázové použití

Fotometr pro mikrotitrační destičky (450 nm)

Promývací zařízení

Zkumavky pro ředění vzorků

Deionizovaná voda

7 Odběr a skladování vzorků

Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum nebo plazma (EDTA, heparin). Chylózní, hemolytické nebo bakteriálně kontaminované vzorky mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky. Sérum se po vysrážení a centrifugaci oddělí od krve, která byla sterilně odebrána ze žíly.

Vzorky séra či plazmy se mohou uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 1 týden. Při delším skladování zmrazte na -20 °C. Vzorky by se neměly opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.

Před provedením testu se musí vzorky (nikoli standardy) naředit v poměru 1:101 Ředicím roztokem vzorků:

Např. 5 µl séra + 500 µl Ředicího roztoku vzorků.

8 Pracovní postup

Pro spolehlivé provedení testu se doporučuje postupovat důsledně podle protokolu. Za veškeré změny a modifikace odpovídá uživatel.

Všechny reagencie a vzorky musí být před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.

Při každém testu by měla být sestrojena kalibrační křivka.

Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

8.1 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok

Před použitím se naředí v poměru 1+9 deionizovanou vodou. Pokud dojde při skladování v chladu k vysrážení krystalů, koncentrát se zahřeje na 37 °C po dobu 15 minut.

8.2 Provedení testu

1. Připravte si adekvátní množství jamek mikrotitrační destičky pro standardy, kontroly, vzorky a pro Blank.

- Nechte jednu jamku prázdnou pro Blank.
- Pipetujte 100 µl standardů a kontrol v **pracovním ředění**. Je doporučeno dávkovat CUT-OFF standard (Kalibrátor B) do dvou jamek.
- Pipetujte do jamek 100 µl každého z **ředěných** (1:101) vzorků.

2. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 60 minut při laboratorní teplotě.
3. Odsajte obsah jamek mikrotitrační destičky a přidejte 300 µl zředěného promývacího roztoku do každé jamky. Tento postup se opakuje celkem třikrát. Na závěr vyklepejte zbytky roztoku do savého materiálu.
4. Dávkujte do každé jamky 100 µl Konjugátu. Nechte jednu jamku prázdnou pro Blank.
5. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě.
6. Odsajte obsah jamek mikrotitrační destičky a přidejte 300 µl zředěného promývacího roztoku do každé jamky. Tento postup se opakuje celkem třikrát. Na závěr vyklepejte zbytky roztoku do savého materiálu.
7. Dávkujte do každé jamky 100 µl Substrátu. Tentokrát se pipetuje také do jamky pro Blank.
8. Destičku překryjte přiloženou fólií a inkubujte 20 minut při laboratorní teplotě v temnu (např. v zásuvce).

9. Reakce Substrátu se ukončí přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku do každé jamky. Dávkujte jej také do jamky pro Blank.
10. Po důkladném promíchání a setření dna destičky odečtěte absorbancii při 450 nm (podle uvážení použijte referenční vlnovou délku 620 nm). Vytvořené zbarvení je stabilní nejméně 60 minut.

9 Hodnocení výsledků

Tabulka 1 Orientační hodnoty absorbancí standardů a kontrol před a po odečtení Blanku

	Absorbance před odečtem Blanku	Absorbance po odečtu Blanku
Blank	0,015	
Negativní kontrola	0,071	0,056
CUT-OFF standard	0,506	0,491
Slabě pozitivní kontrola	0,833	0,818
Pozitivní kontrola	1,640	1,625

Poznámka

Výše uvedená tabulka (Tabulka 1) popisuje pouze příklad, který byl dosažen při určité teplotě a podmínkách prostředí. Popsané údaje tedy **nepředstavují referenční hodnoty**, kterých je možné dosáhnout stejným způsobem v jiných laboratořích.

9.1 Kvalitativní hodnocení

Výpočet Indexu pozitivity (IP)

Dělte absorbanci testovaného vzorku průměrnou absorbancí CUT-OFF standardu naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$IP = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 2).

Tabulka 2 Interpretace výsledků vyšetření

Index pozitivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,8	negativní
0,8 až 1,2	hraniční
větší než 1,2	pozitivní

Pokud se IP vzorku pohybuje v hraniční oblasti, doporučuje se test opakovat se stejným vzorkem, nebo s novým vzorkem od stejného pacienta odebraným po 2 až 4 týdnech. Oba vzorky je třeba testovat paralelně ve stejném stanovení.

Absorbance Pozitivní kontroly (Kalibrátor D) je větší než 2 násobek absorbance CUT-OFF standardu.

9.2 Kvantitativní hodnocení

Koncentrace protilátek ve standardech a kontrolách, které jsou obsaženy v soupravě Adenovirus IgG ELISA, jsou definovány a vyjádřeny v jednotkách (U/ml). Tím je umožněno přesné a reprodukovatelné kvantitativní vyhodnocení. Zároveň jsou pak možné i následné kontroly daného pacienta. Hodnoty koncentrací kontrol a standardů v těchto jednotkách jsou uvedeny na štítcích příslušných lahviček.

Sestrojte kalibrační křivku tak, že na osu X vynesete koncentrace kalibrátorů v U/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Propojením jednotlivých bodů vytvořte kalibrační křivku. Hladinu protilátek ve vzorcích (U/ml) stanovte odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky. Jako CUT-OFF standard slouží Kalibrátor B o koncentraci 10 U/ml. Interpretace výsledků kvantitativního vyhodnocení testu uvádí tabulka (Tabulka 3).

Také je možné využít automatické počítačové programy. Jako proložení křivky je třeba zvolit "point-to-point".

Tabulka 3 Kvantitativní interpretace v jednotkách (U/ml)

Hladina protilátek (U/ml)	Hodnocení
menší než 8	negativní
8 až 12	hraniční
větší než 12	pozitivní

1. Vzorky s hladinou protilátek menší než 8 U/ml hodnotíme jako negativní. Ve vzorku nejsou přítomny specifické protilátky.
2. Jestliže se hladina protilátek ve vzorku pohybuje v rozmezí 8 až 12 U/ml považuje se za hraniční. Doporučuje se test opakovat se stejným vzorkem nebo s novým vzorkem od stejného pacienta odebraným po 2 až 4 týdnech. Oba vzorky je třeba testovat paralelně ve stejném stanovení.
3. Vzorky s hladinou protilátek vyšší než 12 U/ml hodnotíme jako pozitivní.

- Přítomnost IgM protilátek indikuje akutní infekci.
- IgA protilátky jsou ukazatelem akutní infekce nebo reinfekce a přetrvávají po dobu několika měsíců.
- Přítomnost IgG protilátek svědčí o prodělané infekci nebo vakcinaci.

10 Charakteristika soupravy

Tabulka 4 Charakteristika soupravy

Adenovirus ELISA	IgG	IgA	IgM
Intra-assay	7,8 %	7,1 %	7,8 %
Inter-assay	12,3 %	8,4 %	8,0 %
Inter-lot	10,3 až 14,9 %	2,7 až 7,1 %	2,2 až 8,0 %
Analytická citlivost	1,00 U/ml	1,04 U/ml	1,08 U/ml
Výtěžnost	90 až 121 %	79 až 102 %	94 až 99 %
Linearita	81 až 117 %	71 až 122 %	69 až 125 %
Zkřížená reaktivita	nebyla pozorována zkřížená reaktivita s viry chřipky A a RSV		
Interference	nebyly zjištěny interference bilirubinu až do koncentrace 0,3 mg/ml, hemoglobinu až do 8,0 mg/ml a triglyceridů až do 5,0 mg/ml		
Klinická specificita	100 %	98 %	100 %
Klinická senzitivita	100 %	100 %	100 %

11 Literatura

1. Hierholzer JC, Tannock GA. Adenoviruses. In: Rose RR, Friedman H, Fahey JL. Manual of Clinical Laboratory Immunology (third edition). American Society for Microbiology, Washington D.C. 527 (1986).
2. Mc Minn PC, Stewart J, Burrell CJ. A Community Outbreak of Epidemic Keratoconjunctivitis in Central Australia Due to Adenovirus Type 8. J. Inf. Dis., 164: 1113 (1991).
3. Wadell G. Adenoviridae: The adenoviruses. In: Balows, Hausling, Ohasi & Turono. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice. Springer Verlag Berlin, New York, Heidelberg, London, Paris, Tokyo. Vol II: 284 (1988).
4. Wigand R et al. Adenoviridae: Second report. Intervirology 18: 169 (1982).

Souprava je distribuována společností TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.

V případě dotazů nás kontaktujte.

Tel: +420 541 248 311

Email: info@testlinecd.cz