

**VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA
(FSME/TBE IgG/IgM ELISA)**

objednací číslo: EC117.00 barevné kódování : zlatá / průhledná

FSME/TBE IgG Liquor/CSF Standards

objednací číslo: EC117L60

FSME/TBE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

objednací číslo: EN117L65

FSME/TBE IgM Liquor/CSF Standards

objednací číslo: EC117L80

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

**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 použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy IgG/IgM.....	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.....	4
7.4 Použití analyzátorů ELISA.....	5
8. Vyhodnocení testů	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)	5
8.3 Vyhodnocovací schéma IgG a IgM.....	6
8.4 Limity testu.....	6
9. Literatura.....	6
10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata)	7

1. Účel použití

Kit VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA slouží k prokázání akutní nebo nedávno prodělané infekce viru časné letní meningoencefalitidy (TBE), popřípadě detekci očkovacích protilátek.

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenávané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenávané 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 IgG/IgM

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 křivočará)-křen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, připravený k použití
11. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovčí nebo ostrucha křivočará) s křenovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris pufru, ihned použitelné (FCS – fetální telecí sérum)
12. **Substrátový roztok tetrametylbendizin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
13. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

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. Činidla 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 současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
RF SorboTech	nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetrametylbendizin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po zředění (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 shledána negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciálně 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. Víčka na destičky ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitračních destiček
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 předpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

7.1 Testovaný materiál

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

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

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

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

7.2 Příprava reagensů

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

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započítím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagensie před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracího roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráto tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou narušit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá předběžná adsorpce.

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Na test 100µl zředovacího pufru k okamžitému použití (prázdná hodnota), kontrol a zředěných sér pacientů pipetujte. Doporučujeme dvojí test (prázdná hodnota, kontroly a séra pacientů); při cut-off kontrole je dvojí test naléhavě nutný. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např. 10µl sérum + 1ml zředovacího pufru.

2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát 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.
Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
5. Po Inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
6. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
7. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
8. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
9. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o odečteno 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 analyzátorů ELISA

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

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování 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 testů

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

8.1 Kontrola funkčnosti 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. Vypočtené 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.

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

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

8.3 Vyhodnocovací schéma IgG a IgM

Výsledek (VE)	Posouzení	interpretace
< 9,0	negativní	Nejsou prokazatelné žádné protilátky.
9,0 – 11,0	hraniční hodnota	Není signifikantně zvýšená koncentrace protilátek. Opakujte test, případně si vyžádejte 2. vzorek séra.
> 11,0	pozitivní	Signifikantně zvýšená koncentrace protilátek IgM: • čerstvá infekce • nedávno prodělaná infekce • protilátky z důvodu očkování IgG: • nedávno prodělaná infekce • proběhlá infekce • protilátky z důvodu očkování

Upozornění

1. Protože přípravek VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA nerozlišuje mezi výskytem protilátek z důvodu předchozího očkování a protilátkami po prodělané infekci, musí být zohledněn management očkování.
2. Přípravek VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA může vykazovat křížové reakce s jinými flaviviry, takže může pozitivně reagovat například i po infekci viru horečky dengue nebo po očkování proti žluté zimnici.
3. Pacienti chronicky infikovaní TBE mohou mít dlouhá léta zvýšený titr IgM bez prokazatelného titru IgG (7).

8.4 Limity testu

Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.

Přípravek VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA může vykazovat křížové reakce s jinými flaviviry, takže může pozitivně reagovat například i po infekci viru horečky dengue nebo po očkování proti žluté zimnici. Izolované nebo jen mírně zvýšené protilátky IgM (bez IgG) se také vyskytují jako zkřížená reakce proti jiným flavivirům nebo s jinými stimulacemi imunitního systému, a proto diagnózu nepotvrzují (8).

9. Literatura

1. VioMecum, Früh-Sommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) (2003)
2. Blessing, J. in Virusdiagnostik, Diagnostische Bibliothek Band 1 (Hrsg.) Porstmann, T., Blackwell Wissenschafts-Verlag (1996)
3. Chiron Behring Homepage – Verbreitungsgebiete FSME (2003)
4. Baxter Deutschland GmbH – Zecken: FSME-Karte (2003)
5. RKI, Epidemiologisches Bulletin 16/99
6. Forsgren, M. et al., Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related clinical course and outcome, Clin Diagn Virol 1997 Aug; 8 (2): 167-8.
7. Matveeva et al.: Antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) non-structural and structural proteins in human sera and spinal fluid, Immunology Letters, 46 (1995) 1-4
8. Venturi et al.: Humoral immunity in natural infection by tick-borne encephalitis virus. J Med Virol. 2009 Apr;81(4):665-71

Příprava vzorků a promývacího roztoku

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

▼ **zředění vzorky IgG**
1:101

např.:

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

▼ **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

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku
100 µl kontrol
blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu
IgG, IgM

400 µl promývacího roztoku
po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku
opatrně poklepat

mikrofotometr při
450/620nm
(Délka referenční vlny 620-690nm)