

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

Bestell-Nr.: EC117.00 Spalvinis kodas: auksinė/skaidri

FSME/TBE IgG Liquor/CSF Standards

Užsakymo Nr.: EC117L60

FSME/TBE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Užsakymo Nr.: EN117L65

FSME/TBE IgM Liquor/CSF Standards

Užsakymo Nr.: EC117L80

TIK IN VITRO DIAGNOSTIKAI

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

Tel.: +49-6142-6909-0

Fax: +49-6142-966613

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Turinys

1. Paskirtis	3
2. Testo veikimo principas	3
3. Pakuotės turinys (IgG ir IgM testavimo rinkinys)	3
4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas	3
5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai	4
6. Reikalingos papildomos medžiagos (neįeina į tiekimo komplektą)	4
7. Testo eiga	4
7.1 Tiriamoji medžiaga	4
7.2 Reagentų paruošimas	4
7.3 „VIROTECH“ ELISA testo eiga	5
7.4 ELISA procesorių naudojimas	5
8. Testo rezultatų vertinimas	5
8.1 Testo funkcionalumo kontrolė:	5
8.2 „VIROTECH“ vienetų (VE) apskaičiavimas	6
8.3 IgG ir IgM vertinimo schema	6
8.4 Testo interpretavimo apribojimai	6
9. Literatūra	7
10. Testo eigos schema	8

1. Paskirtis

VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA naudojamas ūmios erkinio encefalito viruso (vok. *Frühsummer-Meningoenzephalitis-Virus*, TBE; angl. *Tick-borne Encephalitis Virus*, TBEV) infekcijos arba neseniai persirgtos infekcijos patvirtinimui arba antikūnų po skiepijimo aptikimui.

2. Testo veikimo principas

Žmogaus serume ieškomasis antikūnas sudaro imuninį kompleksą su antigenu, fiksuotu ant mikrotitrų plokštelių. Plovimo metu išplaunami nesurišti imunoglobulinai. Su šiuo kompleksu po to jungiasi konjuguoti fermentai. Nesurišti imunoglobulinai vėl išplaunami plovimo metu. Pridėjus substrato tirpalo (TMB), dėl fermentų (peroksidazės) aktyvumo susidaro mėlynas dažiklis, kuris, pridėjus fiksavimo tirpalo, pagelsta.

3. Pakuotės turinys (IgG ir IgM testavimo rinkinys)

1. **1 mikrotitrų plokštelė**, kurioje yra 96 atskiri, nulaužiami antigeno liofilizatu dengti šulinėliai;
2. **PBS skiedimo buferis (mėlynas, paruoštas naudoti), 2x50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir polisorbatu 20 („Tween 20“);
3. **PBS ploviklis (20x koncentruotas), 50 ml**, pH 7,2, su konservantu ir polisorbatu 20 („Tween 20“)
4. **IgG neigama kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
5. **IgG slenkstinių verčių kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
6. **IgG teigiama kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
7. **IgM neigama kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
8. **IgM slenkstinių verčių kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
9. **IgM teigiama kontrolinė medžiaga, 1300 µl**, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruošta naudoti;
10. **Konjuguotas IgG (prieš žmogaus imunoglobuliną), 11 ml**, (avies arba ožkos) konjugatas su krienų peroksidaze, su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, tiekiamas „Tris“ buferyje, paruoštas naudoti;
11. **Konjuguotas IgM (prieš žmogaus imunoglobuliną), 11 ml**, (avies arba ožkos) konjugatas su krienų peroksidaze, su fetaliniu jaučių serumu (angl. FCS) ir konservantu, tiekiamas „Tris“ buferyje, paruoštas naudoti;
12. **Tetrametilbenzidino substrato tirpalas (3,3',5,5'TMB), 11 ml**, paruoštas naudoti;
13. **Citratinis fiksavimo tirpalas, 6 ml**, su rūgščių mišiniu.

4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas

Laikykite testavimo rinkinį 2–8 °C temperatūroje. Atskirų komponentų tinkamumo laikas nurodytas atitinkamose etiketėse; rinkinio tinkamumo laiką žr. kokybės kontrolės sertifikate.

1. Paėmę reikiamą kiekį šulinėlių, likusius šulinėlius/juosteles laikykite uždareme maišelyje su sausikliu 2–8 °C temperatūroje. Reagentus iškart po naudojimo laikykite 2–8 °C temperatūroje.
2. Paruoštas naudoti konjugatas ir TMB substrato tirpalas jautrūs šviesai ir turi būti laikomi tamsioje vietoje. Jeigu dėl šviesos poveikio pakinta substrato tirpalo spalva, jis naudojimui nebetinka.
3. Imkite tik testų serijai reikalingą paruošto naudoti konjugato arba TMB kiekį. Jeigu paėmėte per daug konjugato arba TMB, pertekliaus atgal supilti negalima, jį reikia išpilti.

Medžiaga	Būsena	Laikymas	Stabilumas
Tiriamieji mėginiai	Praskiesti	nuo +2 iki +8 °C	maks. 6 h
	Nepraskiesti	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė
Kontrolės medžiagos	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai

Mikrotitrų plokštelė	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (laikant kartu tiekiamame maišelyje su sausiklio maišeliu)	3 mėnesiai
RF SorboTech	Nepraskiesti, Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė
Konjugatas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
Tetrametilbenzidinas (TMB)	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
Stabdantysis tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Plovimo tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas iki reikiamos koncentracijos (paruoštas naudoti)	nuo +2 iki +25 °C	4 savaitės

5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai

- Kontrolinėms medžiagoms naudojamas serumas yra ištirtas ir nustatyta, kad jis yra neigiamas ŽIV1-AK, ŽIV2-AK, HCV-AK ir hepatito B paviršinio antigenai, tačiau visus mėginius, atskiestus mėginius, kontrolines medžiagas, konjugatus ir mikrotitrų juosteles reikia laikyti potencialiai užkrečiamos medžiagomis ir dirbant su jomis imtis atitinkamų atsargumo priemonių. Laikykites atitinkamų laboratorijos darbo taisyklių.
- Komponentai, kuriuose yra konservanto, citratinio fiksavimo tirpalo ir TMB, dirgina odą, akis ir gleivines. Sąlyčio su šiomis kūno dalimis atveju nedelsiant nuplauti tekančiu vandeniu ir, jeigu reikia, kreiptis medicininės pagalbos.
- Naudotas medžiagas utilizuokite vadovaudamiesi atitinkamais šalies teisės aktais.

6. Reikalingos papildomos medžiagos (neįeina į tiekimo komplektą)

- Distiliuotas ir demineralizuotas vanduo;
- Daugiakanalė pipetė: 50 µl, 100 µl;
- Mikropipetės: 10 µl, 100 µl, 1000 µl;
- Reagentų buteliukai;
- Cellulioziniai rankšluosčiai;
- Dangtis ELISA plokštelėms;
- Biologiškai pavojingų atliekų konteineris;
- ELISA rankinis arba automatinis mikrotitrų plokštelių plautuvas;
- Mikrotitrų plokštelių spektrofotometras su 450/620 nm filtru (referencinis bangų ilgis 620–690 nm);
- Inkubatorius.

7. Testo eiga

Kad gautumėte teisingus rezultatus, būtinai laikykites bendrovės „VIROTECH Diagnostics“ darbo proceso nurodymų.

7.1 Tiriamoji medžiaga

Tyrimui galima naudoti serumą ir plazmą (šiuo atveju antikoagulantų rūšis reikšmės neturi), nors šiame pakuotės lapelyje nurodytas tik serumas.

Pacientų mėginių skiedinius visada paruoškite šviežiai.

Serumo mėginius, kuriuos reikia laikyti ilgiau, užšaldykite. Negalima kelis kartus atitirpinti užšaldytų mėginių.

- Naudokite tik šviežius, neišaktyvintus serumo mėginius.
- Nenaudokite hiperlipeminių, hemolizinių, mikrobiologiškai užterštų mėginių ir drumsto serumo (galima gauti klaidingai teigiamus arba klaidingai neigiamus rezultatus).

7.2 Reagentų paruošimas

„VIROTECH Diagnostics“ sisteminės diagnostikos priemonės galima naudoti labai lanksčiai, nes skiedimo ir plovimo buferius, TMB, citratinį fiksavimo tirpalą bei konjugatą galima naudoti neatsižvelgiant į parametrus ir partijas. Paruošioms naudoti kontrolinėms medžiagoms (teigiamai kontrolinei medžiagai, slenkstinių verčių kontrolinei medžiagai, neigiamai kontrolinei medžiagai) taikytini specifiniai parametrai ir jas galima naudoti tik su kokybės kontrolės sertifikate nurodytos partijos plokštelėmis.

1. Inkubatoriuje nustatykite 37 °C temperatūrą ir prieš pradėdami inkubuoti patikrinkite, ar ši temperatūra jau pasiekta.
2. Visus reagentus palaikykite kambario temperatūroje, tik po to atidarykite pakuotę su diagnostinėmis juostelėmis.
3. Visus skystus komponentus prieš naudojimą gerai pakratykite.
4. Plovimo tirpalo koncentratą iki 1 litro papildykite distiliuotu (dejonizuotu) vandeniu (jeigu koncentrate yra susidariusių kristalų, prieš skieddami atšildykite jį iki kambario temperatūros ir prieš vartojimą gerai suplakite).
5. Didelė IgG arba reumatinių veiksnių koncentracija gali turėti neigiamos įtakos IgM antikūnų aptikimui ir galima gauti klaidingai teigiamus arba klaidingai neigiamus rezultatus. Serumus prieš tai reikia apdoroti su „RF-SorboTech“ (VIROTECH adsorbicine priemone). Atliekant IgM kontrolę, pirminio adsorbavimo atlikti nereikia.

7.3 „VIROTECH“ ELISA testo eiga

1. Kiekvienam testavimo ciklui pipete įlašinkite 100 µl paruošto naudoti skiedimo buferio (neutralioji vertė), kontrolinių medžiagų ir praskiestų paciento serumo mėginių. Patartina visada atlikti du tyrimų ciklus (neutraliosios vertės, kontrolinių ir paciento serumo mėginių); atliekant slenkstinių verčių kontrolę du ciklus atlikti būtina. Darbinis paciento serumo skiedimas: 1+100; pvz., 10 µl serumo + 1 ml skiedimo buferio.
2. Pipete įlašinus medžiagas, jos 30 minučių inkubuojamos 37 °C temperatūroje (uždengus).
3. Inkubavimo periodas baigiamas atliekant 4 plovimo ciklus, kiekvienam šulinėliui išplauti naudojant po 350–400 µl ploviklio. Nepalikite ploviklio šulinėliuose; skysčio likučiams pašalinti apverskite plokštelę ant celiuliozinio rankšluosčio ir pabelskite dugną.
4. Pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 µl paruošto naudoti konjugato.
5. Konjugatų inkubacija: 30 min. 37 °C temperatūroje (uždengus).
6. Inkubavimo periodas baigiamas atliekant 4 plovimo ciklus (žr. 3 punktą).
7. Pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 µl paruošto naudoti TMB substrato tirpalo.
8. Substrato tirpalo inkubacijos trukmė: 30 min. 37 °C temperatūroje (uždengus, tamsioje vietoje).
9. Reakcijos su substratu fiksavimas: pipete į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 50 µl citratinio fiksavimo tirpalo. Atsargiai ir atidžiai papurtykite plokštelę, kad gerai susimaišytų visi skysčiai ir matytumėte vientisą geltoną spalvą.
10. Ekstinkcijas išmatuokite per 450/620 nm filtrą (referencinis bangų ilgis 620–690 nm). Nustatykite fotometrą, kad iš visų kitų ekstinkcijų būtų atimama išmatuota neutralioji vertė. Fotometrinį matavimą reikia atlikti per vieną valandą po fiksavimo tirpalo pridėjimo.

Testo eigos schemą žr. paskutiniame psl.

7.4 ELISA procesorių naudojimas

Visus „VIROTECH Diagnostics“ ELISA tyrimus galima apdoroti ELISA procesoriais. Naudotojas įsipareigoja atlikti periodinį prietaisų kalibravimą.

Bendrovė „VIROTECH Diagnostics“ rekomenduoja atlikti šiuos veiksmus:

1. Ilgesnį laiką nenaudojant ELISA procesoriaus arba po didesnio remonto, bendrovė „VIROTECH Diagnostics“ rekomenduoja sukalibruoti prietaisą pagal prietaiso gamintojo nuorodas.
2. Po to patartina ELISA procesorių patikrinti naudojant kalibravimo rinkinį (EC250.00). Tokią reguliarią patikrą su kalibravimo rinkiniu reikia atlikti ne rečiau nei vieną kartą per tris mėnesius.
3. Kiekvieno testo metu turi būti įvykdyti preparato kokybės kontrolės sertifikate nurodyti leidimo naudoti kriterijai. Toks būdas užtikrina nepriekaištingą Jūsų ELISA procesoriaus veikimą, o taip pat ir laiduoja laboratorijos darbo kokybę.

8. Testo rezultatų vertinimas

Paruoštos naudoti kontrolinės medžiagos skirtos pusiau kiekybiniam specifinių IgG ir IgM antikūnų nustatymui, koncentraciją pateikiant „VIROTECH“ vienetais (vok. VE). Testo eigoje atsiradę svyravimai kompensuojami matematiniu būdu ir užtikrinamas aukštas laipsnio atstatomumas. VE skaičiuojami pagal vidurinį OD verčių diapazoną.

8.1 Testo funkcionalumo kontrolė:

a) OD vertės

Neutraliosios vertės OD vertė turi būti < 0,15.

Neigiamų kontrolinių medžiagų OD vertės turi būti mažesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes; teigiamų kontrolinių medžiagų ir slenkstinių verčių kontrolinių medžiagų OD vertės turi būti didesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes.

b) „VIROTECH“ vienetai (VE)

Nustatoma 10 „VIROTECH“ vienetų (vok. VE) slenkstinių verčių kontrolinių medžiagų VE vertė. Apskaičiuota teigiamų kontrolinių medžiagų VE vertė turi būti kokybės kontrolės sertifikate nurodytame diapazone.

Jeigu reikalavimai neįvykdyti (OD verčių, VE), testą reikia pakartoti.

8.2 „VIROTECH“ vienetų (VE) apskaičiavimas

Iš visų ekstinkcijų reikia atimti neutralios vertės (450/620 nm) ekstinkciją.

$$VE_{\text{ (teigiama kontrolė) }} = \frac{OD_{\text{ (teigiama kontrolė) }}}{OD_{\text{ (slenkstinė įverči kontrolė) }}} \times 10$$

$$VE_{\text{ (paciento serumas) }} = \frac{OD_{\text{ (paciento serumas) }}}{OD_{\text{ (slenkstinė erčr kontrolė) }}} \times 10$$

8.3 IgG ir IgM vertinimo schema

Rezultatas (VE)	Įvertinimas	Interpretavimas
< 9,0	neigiami	Antikūnų neaptikta
9,0 – 11,0	ribiniai	Žymaus antikūnų koncentracijos padidėjimo nenustatyta Pakartoti testą arba (jeigu reikia) paimti antrą serumo mėginį
> 11,0	teigiami	Nustatytas žymus antikūnų koncentracijos padidėjimas IgM: • Ūmi infekcija • Neseniai persirgta infekcija • Skiepavimo metu susidarę antikūnai IgG: • Neseniai persirgta infekcija • Lėtinė infekcija • Skiepavimo metu susidarę antikūnai

Nuorodos

1. Kadangi VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA tyrimu negalima skiepavimo metu susidariusių antikūnų atskirti nuo antikūnų po infekcijos, reikia atkreipti dėmesį į skiepimų planą.
2. VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA tyrimas gali kryžmiškai reaguoti su kitais flavivirusais, todėl, pvz., po užsikrėtimo Dengė virusu arba skiepavimo nuo geltonosios karštinės, irgi gali būti nustatyta teigiama reakcija.
3. Taip pat lėtinis erkinis meningoencefalitu sergantiems pacientams IgM titras iki (7) metų gali išlikti padidėjęs, o IgG – nepakitęs.

8.4 Testo interpretavimo apribojimai

Serologiniai rezultatai interpretuoti tik atsižvelgiant į klinikinę būklę, epidemiologinius duomenis ir (jeigu yra) kitus laboratorinių tyrimų duomenis.

VIROTECH FSME/TBE IgG/IgM ELISA tyrimas gali kryžmiškai reaguoti su kitais flavivirusais, todėl, pvz., po užsikrėtimo Dengė virusu arba skiepavimo nuo geltonosios karštinės, irgi gali būti nustatyta teigiama reakcija. Izoliuoti arba tik šiek tiek padidėję IgM antikūnai (be IgG) taip pat randami kaip kryžminė reakcija prieš kitus flavivirusus arba su kitomis imuninės sistemos stimuliacijomis, todėl nepatvirtina diagnozės (8).

9. Literatūra

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

Paciento mėginių ir ploviklio paruošimas

▼ **Ploviklis:** Koncentratą atskiesti dist./demin. vandeniu, kad susidarytų 1 litras skysčio

▼ **IgG mėginiai – atskiesti 1:101**

Pvz.:

10 µl serumo (plazmos) + 1000 µl skiedimo buferio
(serumo skiedimo buferis paruoštas naudoti)

▼ **IgM mėginiai – atskiesti 1:101**
atlikti reumatinių veiksnių adsorbciją su „RF-SorboTech“

Pvz.:

5 µl serumo (plazmos) + 450 µl skiedimo buferio +
1 lašas „RF-SorboTech“ ir 15 min. inkubuoti kamb. temp.

Testo eiga

Mėginių inkubavimas

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl pacientų mėginiai

Neutralioji vertė (skiedimo buferis) ir
kontrolinės medžiagos

4 x plauti

400 µl ploviklis

gerai pabelsti, kad pasišalintų perteklius

Konjugato inkubacija

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl konjugato

IgG, IgM

4 x plauti

400 µl ploviklis

gerai pabelsti, kad pasišalintų perteklius

Substrato inkubacija

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl substrato

Fiksavimas

50 µl fiksavimo skysčio

atsargiai papurtyti, kad susimaišytų

Ekstinkcijos
matavimas

**Fotometras su 450/620 nm
filtru**
(referencinis bangų ilgis 620–
690 nm)