MASTAZYME™ FSME IgG

Enzymatická imunoesej pro detekci a kvantifikaci lidských protilátek IgG proti viru TBE (Tick-borne-encephalitis) v séru a plasmě

Návod na použití

CE

Pouze pro *in vitro* diagnostiku

Test	Kód	Kit pro
MASTAZYME™ FSME/TBE IgG	680501	12 x 8 testů

Skladování: 2–8 °C

Obsah **Strana**

1.	Úvod	3
2.	Použití	3
3.	Princip testu	3
4.	Součásti soupravy	4
5.	Potřebný materiál, který není součástí soupravy	4
6.	Upozornění a zvláštní opatření	5
7.	Uchovávání a trvanlivost reagencií	5
8.	Odběr a manipulace se vzorkem	5
9.	Pracovní postup	5
10.	Interpretace výsledku	6
11.	Charakteristika testu	7
12.	Literatura	7

1. Úvod

Infekce TBEV se vyskytuje převážně v časném létě díky kousnutí klíštětem infikovaným TBEV. Klíšťata se mohou nakazit v kterékoli fázi jejich metamorfózy a přenášet virus diaplacentálně. Předpokládá se, že virus hibernuje v klíštěti nebo v obratlovcích jako je dikobraz, plch, netopýr a jelen. Inkubační doba je 4 - 21 dní. Tyto viry byly dříve nazývány arboviry (arthropod-borne viry) a jsou sloučeny dle jejich funkce do skupiny infekčních patogenů, které jsou přenášeny mezi obratlovci kousnutím krev sajícími členovci. Tyto viry replikují v orgánech přijímajících členovců, aniž by došlo k příznakům choroby nebo poškození tkáně.

Díky cyklu obratlovec-členovec-obratlovec zůstává virus stále naživu, členovec se stane celoživotně infekční díky sání krve z obratlovců ve viremické fázi. Dnes je TBEV přiděleno do skupiny flavivirů. Sérologicky TBEV patří do flavivirů skupiny B. Patogeny jsou tvořeny jednovláknovou RNA a jsou inaktivovány éterem a deoxycholátem sodným. Virus se může množit v mozku novorozených myší, ale také v buněčných kulturách (BHK-21 a Vero buňkách). Replikace viru probíhá v cytoplasmě infikovaných buněk. Viriony se formují v Golgiho aparátu. Velikost virových částic je 80-100 nm. Viry jsou přenášeny klíšťaty *Ixodes ricinus*.

Pro onemocnění je charakteristické postižení bulbárních a cervikálních částí páteřní kostní dřeně, stejně tak, jako vzestupnou paralýzou a hemiparézou. Výskyt zbytkové paraplegie po infekci není neobvyklý. Typické infekce vykazují dvoufázový průběh onemocnění: První fáze nákazy je doprovázena netypickou horečkou se silnými bolestmi hlavy, druhá fáze meningo-encefalitidy je s nebo bez parézy. Po inkubační době 3-28 dnů (v závislosti na množství infekčních agens) se vyvíjí v počáteční fázi nespecifické chřipkové příznaky. Po 3-7 dnech příznaky slábnou přibližně u 10% případů, druhá fáze onemocnění se vyvíjí k opětovnému růstu teploty, bolestem hlavy, bolestem v končetinách a meningo-encephalitické příznaky. Může dojít k ochrnutí v oblasti lopatky. O několik dní později začíná fáze zlepšování, která obvykle trvá 1-3 týdny. Při postižení CNS se jedná o reziduální poškození, které se vyskytuje asi u 7% případů, úmrtnost se pohybuje kolem 1%. Klinický obraz TBEV je netypický. Proto je nutná sérologická laboratorní diagnostika. Diagnóza časné infekce se provádí detekcí specifických protilátek IgM.

Specifické IgG protilátky se určují ze dvou důvodů:

a) Pro sledování průběhu onemocnění po infekci TBEV (významná změna titru)

b) Pro zjištění "stavu imunity" po "aktivní imunizaci" (ochrana očkováním)

2. Použití

Souprava MASTAZYME™ FSME IgG (TBE Virus = Tick-Borne Encephalitis Virus) antibody ELISA je určena pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG proti TBE viru v séru a plasmě. Na vyžádání je možné test provádět i v dalších tělních tekutinách.

Tento test je určen pouze pro použití *in-vitro*. Všechny výsledky testu musí být interpretovány v souvislosti s ostatními klinickými ukazateli. Pro správnou klinickou interpretaci musí být vzaty v úvahu i výsledky dalších laboratorních testů.

3. Princip testu

Princip testu může být popsán ve čtyřech fázích.

3.1 Inkubace séra

Specifické protilátky se váží k antigenům, které jsou na pevné fázi, a tím vzniká stabilní imunokomplex.
Po 60-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě jsou jamky promyty předem zředěným promývacím pufrem, čímž se odstraní všechny nereaktivní komponenty v séru.

3.2 Inkubace s konjugátem

Anti-lidský –IgG konjugát s křenovou peroxidázou je přidán do každé jamky. Konjugát se váže k protilátkám IgG (respektive k antigenu na pevné fázi) a vytváří se tak stabilní „sandwich˝. Po 30-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě je přebytečný konjugát odstraněn promytím každé jamky promývacím pufrem.

3.3 Reakce se substrátem a její zastavení

Do každé jamky je přidán TMB substrát a v reakci mezi ním a enzymem peroxidázou vznikne stabilní modrý chromogen. Reakce s následnou tvorbou zabarvení je zastavena po 20-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě přidáním 0.5 N H_2SO_4 do jamek. Změna pH způsobí, že se modrá barva chromogenu změní na žlu tou.

3.4 Vyhodnocení a interpretace

Intenzita zbarvení je vyhodnocena v readeru při 450 nm (doporučená referenční vlnová délka pro bichromatické měření: 600 – 690 nm).
Intenzita zbarvení (OD) je přímo úměrná koncentraci specifických protilátek v séru pacienta.
Výsledky lze číst z kalibrační křivky nebo ze souboru elektronických grafů pomocí 4 parametrů sigmoidální křivky.

4. Součásti soupravy

Souprava se skládá z reagencií pro 12 x 8 = 96 stanovení. Mikrotitrační stripy a roztoky musí být skladovány při teplotě 2 – 8 °C. Datum expirace je uvedeno na štítku.

12	Mikrotitrační stripy	jednotlivé stripy obsahují 8 odlamovatelných jamek s navázaným antigenem TBE viru
1	Držák	
4 x 1,5 ml	Kalibrátory 1–4	Stabilizovaná lidská plasma s obsahem protilátek proti TBE předředěná pufrem. Kalibrátory připraveny k použití

	Anti-FSME IgG koncentrace [VU/mL]
Kal. 1	1
Kal. 2 (cut-off)	100
Kal. 3	400
Kal. 4	1600
Pozitivní kontrola	800
Negativní kontrola	50

2 x 60 ml	Sérum diluent	roztok PBS/BSA pufru, obsahuje < 0,1 % azidu sodného jako konzervantu, připraven k použití
1 x 1,5	Negativní kontrola	Stabilizovaná lidská plazma, připravena k použití, může být integrována do kalibrační křivky
1 x 1,5	Pozitivní kontrola	Stabilizovaná lidská plazma, připravena k použití, může být integrována do kalibrační křivky
1 x 12 ml	Roztok HRP konjugátu	HRP-značené kozí anti-lidské -IgM protilátky, připraven k použití
1 x 12 ml	TMB substrát	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, připraven k použití
1 x 12 ml	Stop roztok	0.5 N kyselina sírová, připraven k použití
2 x 50 ml	Promývací pufr 10 x koncentrovaný	roztok PBS/Tween pufru 10x koncentrovaný, naředit 1:10 před použitím, koncentrát muže být zahrát až do 37 °C po dobu 15 min. k zabránení vzniku krystalů

5. Potřebný materiál, který není součástí soupravy

- 5 µL-, 100 µL- a 500 µL mikro- a multikanálové pipety
- ELISA reader se 450 nm filtrem (referenční filtr 600 – 690 nm)
- Promývač mikrotitračních destiček (v případě manuálního promývání: promývací lahev)
- Zkumavky na ředění sér pacientů
- Odměrný válec

- Destilovaná voda nebo voda vyšší kvality

6. Upozornění a zvláštní opatření

- Pouze pro *in-vitro* diagnostiku! Zabraňte požití či spolknutí! Při práci dodržujte laboratorní bezpečnostní opatření. V laboratoři nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Séra, plasmy a pufry této soupravy byly testovány všeobecně uznávanými metodami a jsou negativní na HBsAg a protilátky proti HIV a HCV. Nicméně z preventivních důvodů je nutné při práci používat ochranné latexové rukavice.
- Skvrny způsobené séry či reagenciemi musí být důkladně odstraněny za použití desinfekčních roztoků (např. 5% chlornan sodný).
- Před prováděním testu je nutné nechat všechny reagencie vytemperovat na pokojovou teplotu (18–24 °C).
- Před použitím je nutné reagencie důkladně, ale jemně promíchat např. krouživými pohyby. Vyhněte se třepání, které vede k následné tvorbě pěny.
- Aby byly zajištěny stejné podmínky testu ve všech jamkách mikrotitrační destičky, je nutné pipetovat reagencie ve stejných intervalech.
- Před použitím reagencií se ujistěte, zda není uzávěr či lahvička poškozena a nedošlo tím k možné kontaminaci. Vyvarujte se vzájemného smíchání reagencií. Protože jsou reagencie často citlivé k oxidaci, je nutné nechávat lahvičky s nimi otevřené pouze po krátkou dobu.
- Kvůli zabránění vzniku kontaminace je nutné používat jednorázové, vyměnitelné špičky na pipety.
- Není možné míchat či jinak používat reagencie ze stejných souprav o jiné šarži.
- Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace.
- V souladu se Správnou Laboratorní Praxí (SLP) a ISO 9001 by měly být veškeré laboratorní pomůcky a přístroje používané pro provedení testu prověřeny z hlediska přesnosti. Toto se týká především pipet, promývacích a čtecích zařízení (ELISA readeru).
- Vyhněte se kontaktu určitých reagencií, a to především stop roztoku a substrátu, s pokožkou, očima a sliznicemi. Hrozí zde riziko podráždění, poleptání a intoxikace.

7. Uchovávání a trvanlivost reagencií

Všechny reagencie skladujte při teplotě 2 – 8 °C.

Datum expirace každé reagencie je uvedeno na štítku lahvičky. Reagencie nepoužívejte po datu jejich expirace. Naředěný promývací pufr je stabilní až 4 týdny, pokud je skladován při teplotě 2 – 8 °C. Otevřený kit by měl být zpracován během 3. měsíců.

8. Odběr a manipulace se vzorkem

Pro stanovení se používá sérum nebo plasma (EDTA, heparin). Vzorky séra či plasmy se skladují při teplotě 2 – 8 °C po dobu max. 3 dnů. Po delší dobu mohou být vzorky skladovány při teplotě -20 °C. Po rozmražení vzorky znovu nezmrazujte. Lipemické, hemolytické nebo bakteriemi kontaminované vzorky mohou způsobit falešnou pozitivitu či falešnou negativitu výsledku. Pacientská séra musí být předředěna sérum diluentem v poměru 1:101 (např. 5 µl séra + 500 µl sérum diluentu).

Vzorky s koncentrací protilátek přesahující hodnotu koncentrace v nejvyšším (nejkoncentrovanějším) kalibrátoru musí být dále zředěny sérum diluentem.

9. Pracovní postup

9.1. Příprava reagencií

Před použitím nechte všechny součásti soupravy a také vzorky vytemperovat na laboratorní teplotu (18 – 24 °C), reagencie jemně promíchejte.

Promývací pufr: Rozpusťte krystalky, které se mohou v lahvičce vyskytovat, zahřátím na teplotu 37 °C, a poté jemně promýchejte.

Nařeďte koncentrovaný promývací pufr v poměru **1:10 destilovanou vodou** (např. 50 ml koncentrovaného pufru + 450 ml destil. vody). Důkladně promýchejte.

- Pro správné provedení testu je nutné důsledně postupovat podle přiložených instrukcí. Veškeré změny a modifikace jsou v rámci odpovědnosti uživatele.
- Všechny reagencie a vzorky musí být před použitím při laboratorní teplotě, ale neměly by se této teplotě vystavovat po dobu delší, než je nezbytně nutné.
- Kalibrační křivka by měla být sestrojena při každém testu.
- Nepoužité mikrotitrační stripy vložte zpět do plastového obalu a uchovávejte je v suchu při teplotě 2 – 8°C.

9.2. Provedení testu

Připravte si dostatečné množství jamek v mikrotitračních stripech pro kalibrátory, kontroly a vzorky.

Poznámka: Je možné využít i jiné inkubační podmínky. V případě změn v doporučeném pracovním postupu (např. inkubace při teplotě 37 °C místo laboratorní teploty) musí uživatel validovat takovéto provedení testu.

1. Pipetujte **100 µL** naředěného vzorku (1:101) a kalibrátorů do příslušných jamek.
2. **Inkubujte** při laboratorní teplotě po dobu **60-ti minut.**
3. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru.** Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitr. destičky na papírovém ručníku.
4. Pipetujte **100 µL roztoku HRP konjugátu** do každé jamky.
5. **Inkubujte** při laboratorní teplotě po dobu **30-ti minut.**
6. Odstraňte přebytečný obsah z mikrojamek a **3 x je promyjte 300 µL naředěného promývacího pufru.** Poté odstraňte zbytky promývacího roztoku lehkým poklepáním mikrotitr. destičky na papírovém ručníku.
7. Pipetujte **100 µL TMB substrátu** do každé jamky.
8. **Inkubujte po dobu 20 minut ve tmě** při laboratorní teplotě.
9. Přidejte **100 µL stop roztoku** do každé jamky.
10. Po důkladném promíchání a vysušení dna mikrojamek **změřte optickou hustotu při 450 nm** a vypočítejte výsledky. Blank měřte proti vzduchu. Je doporučeno bichromatické měření za využití referenčních vlnových délek 600 – 690 nm.

Vytvořené zbarvení je stabilní alespoň 30 minut. Meřte optické hustoty během této doby.

10. Interpretace výsledků

Příklad IgG kalibrační křivky

	VU/mL*	OD 450 nm
Kal. 1	1	0,009
Kal. 2 (cut-off)	100	0,835
Kal. 3	400	1,821
Kal. 4	1600	2,454
Pozitivní kontrola	800	2,154
Negativní kontrola	50	0,483

*VU = Vienna jednotky

Výše uvedená data v tabulce mohou být považována za příklad, který byl dosažen při určité teplotě a okolních podmínkách. Tato data **nepopisují** referenční hodnoty, kterých je možné dosáhnout v různých laboratořích stejným způsobem!

10.1 Kvalitativní hodnocení

Vypočítané hodnoty OD pro séra pacientů jsou porovnávány s hodnotami cut-off kalibrátoru. Jestliže je hodnota vzorku vyšší, pak je vzorek považován za pozitivní.

Jestliže je hodnota vzorku nižší než hodnota cut-off kalibrátoru, pak je vzorek považován za negativní. Považuje se za rozumné definovat tzv. „šedou zónu“ v rozmezí ± 10% od cut-off hodnoty. Je doporučeno opakovat vyšetření za využití stejného séra či nového vzorku od stejného pacienta odebraného po 2 – 4 týdnech, pokud se hodnoty vzorku nacházejí v této „šedé zóně“. Oba vzorky je možné testovat paralelně.

10.2 Kvantitativní hodnocení

V soupravě MASTAZYME FSME IgG obsažené kalibrátory jsou připraveny k použití a koncentrace protilátek jsou uvedeny ve Vienna jednotkách (VU/mL).

Tímto je umožněna přesná a reprodukovatelná kvantifikace a v důsledku toho je možné monitorovat titry protilátek v séru pacienta. Hodnoty koncentrací pro jednotlivé kalibrátory jsou uvedeny na štítcích příslušných lahviček.

Kalibrační křivka může být sestrojena na milimetrovém papíře vynesením středních hodnot absorbancí kalibrátoru na osu y a odpovídajících hodnot jejich koncentrací na osu x. Následně mohou být koncentrace protilátek v séru pacienta odečítány přímo z takového grafického zobrazení.

Výpočet výsledku může být také proveden za využití počítace s odpovídajícím softwarem.

11. Charakteristika testu

Charakteristiky ELISA testu MASTAZYME FSME IgG byly stanoveny a posouzeny v souladu s Evropskými IVD direktivami. Detailní validační data mohou být poskytnuta na zvláštní přání.

12. Literatura

1. Ackermann R et al. Die Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Dtsch. med. Wschr 111: 927 (1986).
2. Ackermann R et al. Die Zentraleuropäische Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland; Fortschr. Neurol. Psychiat. 47: 103 (1979).
3. Baumberger P et al. Development of early-summer meningoencephalitis (FSME) in the Thurgau region 1990–1995 – a new endemic area; Schweiz. Med. Wochenschr. 126: 2072 (1996).
4. Burkhardt U et al. Viral infections - clinical pictures and laboratory diagnosis. Part 2: Coxsackie B virus, echovirus, enteroviruses, EBV, FSME virus and yellow fever virus; Fortschr. Med. 111: 510 (1993).
5. Chlabicz S et al. Clinical picture of tick-borne encephalitis among patients hospitalised in 1994; Rocz. Akad. Med. Bialymst. 41: 35 (1996).
6. Grubbauer HM et al. Tick-borne encephalitis in a 3-month-old child; Europ. J. Pediatr. 151: 743 (1992).
7. Haglund M et al. A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: Need for a vaccination strategy; Scand. J. Infect. Dis. 28: 217 (1996).
8. Harabacz I et al. A randomised phase II study of a new tick-borne encephalitis vaccine using three different doses and two immunisation regimens; Vaccine 10: 145 (1992).
9. Hug B et al. A case from practice (362). Early summer meningitis. FSME-IgG and IgM-positive; Schweiz. Rundsch. Med. Prax., 85: 1495 (1996).
10. Müller KD et al. Serological studies of early summer meningoencephalitis risk in the Saarland; Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A] 264: 201 (1987).