

Novagnost[®] Ascaris lumbricoides IgG

ASC/G

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Ascaris lumbricoides* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 10 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 10 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 puslapyje.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Ascaris lumbricoides* specifinių IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume arba plazmoje (apdorotoje citratais). Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Askaridės yra dideli nematodai. Vyrishkos lyties individai yra iki 25 cm ilgio, o moteriškos lyties – iki 40 cm ilgio. *Ascaris lumbricoides* tarp visų *Ascaridae* rūšių yra svarbiausią vietą žmogaus medicinoje užimanti rūšis, nes tik šios rūšies individams žmogus yra pagrindinis šeimininkas. Lytiškai subrendusios apvaliosios kirmėlės gyvena plonajame žarnyne. Moteriškos lyties individai per dieną padeda iki 200 000 kiaušinėlių, kurie per išmatas paplinta aplinkoje. Infekciją sukeliančios lervos vystosi kiaušinėliuose, o juos prarijus, jos išsivertina viršutinėje plonųjų žarnų dalyje. Lervos prasiskverbia per plonosios žarnos sienelę ir patenka į veninį kraują, per kurį nukeliauja į kepenis ir plaučius, kur palieka kraujagysles ir pereina į alveolių sienelės. Lervos migruoja į trachėją ir per ryklę vėl yra nuryjamos atgal į plonąją žarnyną, kur subręsta iki suaugusios kirmėlės. Praėjus maždaug 10–12 savaičių po užsikrėtimo apvaliosios kirmėlės išsiskiria su išmatomis. Suaugusi kirmėlė gyvena maždaug 18 mėnesių.

Ascaris lumbricoides yra vienas gausiausių infekcinių ligų sukėlėjų visame pasaulyje. Pagrindinės endeminės sritys yra Rytų Azija, Afrika ir Vidurio bei Pietų Amerika. Kirmėlės dažniau pažeidžia vaikus nei suaugusius. Užsikrėtus susergama askariaze, kuriai dažniausiai būdingas latentinio pobūdžio progresavimas. Migruojančios lervos gali sukelti uždegimą, plaučių eozinofilinę infiltraciją, dėl to gali atsirasti kosulys, dusulys ir nedidelis karščiavimas. Vienoje vietoje susikaupusios kirmėlės gali užkimšti žarnyną. Jeigu kirmėlės migruoja į tulžies pūslę, kasą ar skrandį, gali atsirasti atitinkamų simptomų.

Rūšys	Liga	Simptomai	Infekcijos mechanizmas
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Askariazė	Suaugusios kirmėlės dažniausiai simptomų nesukelia. Vienoje vietoje susikaupusios kirmėlės gali sukelti pilvo skausmą ir žarnų nepraeinamumą. Tulžies pūslės, kasos ar skrandžio infekcija gali sukelti atitinkamų simptomų. Migruojančios lervos gali sukelti plaučių simptomų, pavyzdžiui, kosulį ir dusulį.	Nurijus infekciją sukeliančių askaridžių kiaušinėlių (klasikinis užsikrėtimo būdas yra maitinimasis mėšlu užterštomis salotomis).

Infekciją galima nustatyti:

– mikroskopu – išmatose rasti kiaušinėlių;

serologiniais metodais – randant antikūnų imunofermentiniu tyrimo metodu (*ELISA*).

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *Ascaris lumbricoides* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas ELISA (fermentais žymėtos imunisorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *Ascaris lumbricoides* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklintas A baltymo konjugatas susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiems prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksidą) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių- *Ascaris lumbricoides* antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

Novagnost® <i>Ascaris</i> IgG:	1 x 96
Novagnost® <i>Ascaris</i> IgG (testo plokštelė, padengta <i>Ascaris lumbricoides</i> antigenais):	1
A baltymo konjugatas (gautas iš <i>Staphylococcus aureus</i>):	2 x 10 ml
Askaridžių kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Askaridžių ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Askaridžių kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Buferis IgG-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis Novagnost linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais Novagnost linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietoj Novagnost plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

Novagnost® Ascaris IgG testo plokštelė: Laužomos juostelės yra padengtos askaridžių antigenais ir paruoštos naudoti.

Baltymo A konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėto baltymo A, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

Askaridžių kontrolinis serumas, teigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

Askaridžių ribinės vertės kontrolinis serumas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

Askaridžių kontrolinis serumas, neigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojimui nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami.

Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipėčių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelį.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. Novagnost® ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinus reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Ascaris IgG testo plokštelė:

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje.

Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė. Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
Novagnost® Ascaris IgG testas plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Baltymo A konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Askaridžių kontrolinis serumai (neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos

[rašyti tekstą]

Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP® III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Ascaris* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo).

Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio.

Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį.

Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį.

Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 μl praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 μl baltymo A konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. (± 2 min.) $+20 - +25^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.
9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 μl TMB substrato tirpalo.
10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo $+20$ iki $+25^{\circ}\text{C}$), apsaugokite ją nuo šviesos.
11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 μl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant **BEP[®] III**

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
 2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
 3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į Ascaris IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį.
- Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį.
- Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu neužklijuokite. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostelės) reikia užpildyti vandeniu.
- BEP[®]III programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau BEP[®]III įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost[®]* produktais.

Procedūra panaudojant **BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]**

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP[®] 2000/ BEP 2000 Advance[®]* naudojimo vadovą).

BEP[®]2000/ BEP 2000 Advance[®] programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU naudojamas laikas / tūriai, tačiau *BEP[®]2000/ BEP 2000 Advance[®]* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost[®]* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $< \text{už ribinę vertę}$;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 < \text{ribinė vertė} < 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $> \text{už ribinę vertę}$.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriaai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,39 + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38

Ribinė vertė = 0,38

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai *Novagnost[®]* vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė x 10 = [Novagnost[®] Units = U]

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: < 8,5 U

Teigiamas: > 11,5 U

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)
Teigiamas serumas	16	1,52	3,1
Neigiamas serumas	16	0,52	3,8
Tiriant skirtingais metodais	n	Vidutinis (U)	CV (%)
Teigiamas serumas	12	13,6	4,8
Neigiamas serumas	12	2,7	7,0

Specifiškumas

Diagnosticinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra 95 proc.

Jautrumas

Diagnosticinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Jautrumas yra > 95 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš gelta patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0,5 mg/ml bilirubino.

Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.
6. Negalima atmesti antigenų kryžminių reakcijų su antikūnais *Toxocara canis*, *Trichinella*, *Fasciola*, *Filaria* ir *Strongyloides* galimybės.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] Ascaris IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100 su IgG
buferiniu tirpalu mėginiams skiesti

Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / 37° C $\pm 1^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / nuo +20 iki +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. Cook G. C. (Hrsg) (1996) Manson's tropical diseases, 20th edn. Saunders, Philadelphia London.
2. Guerrant R. L., Walker D. H., Weller P. F. (eds) (1999) Tropical infectious diseases. Principles, Pathogens, and Practice. Churchill Livingstone, Philadelphia.
3. McSharry, C.; Xia, Y., Holland, C. V. and Kennedy, M. W. (1999) Natural Immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infection and Immunity*, 67 (2), 484-489.

Novagnost® Chlamydia pneumoniae IgG

CHLP/G

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Chlamydia pneumoniae* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 psl.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių *Chlamydia pneumoniae* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ar plazmoje (apdorotoje citratais). Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Chlamidijos yra nejudrios, gram-neigiamos tik ląstelių viduje augančios bakterijos, užkrėstų ląstelių citoplazmoje sudarančios charakteringus intarpus. Jie yra lengvai pastebimi šviesos mikroskopu. Žinomos trys žmonėms patogeniškos *Chlamydia* rūšys: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* (neseniai pavadinimas pakeistas į *Chlamydophila pneumoniae*) ir *Chlamydia psittaci*; viena rūšis yra patogeniška tik gyvūnams (*C. pecorum*). *Chlamydia trachomatis* yra labiausiai paplitęs lytiniu keliu plintančių infekcijų sukėlėjas visame pasaulyje (400 – 500 milijonų atvejų), infekcinių susirgimų skaičius nuolat didėja. Nėščiosios, užsikrėtusios *C. trachomatis*, šiomis bakterijomis gimdydamos gali užkrėsti naujagimį; naujagimiams gali išsivystyti konjungtyvitas ar pneumonija. Chlamidijų sukeltos infekcijos negydant liga gali komplikuotis lėtiniu salpingitu, kuris būti negimdinio nėštumo ar nevaisingumo priežastimi. Vyrams *C. trachomatis* yra pagrindinė negonokokinio uretrito priežastis. Sudėtinga su *Chlamydia* sukeltomis infekcijomis susijusi problema yra dažnai simptomų nesukelianti slapta ligos eiga, todėl infekcija gali būti lėtinių ligų išsivystymo priežastimi. Daugeliu atvejų pirminė infekcija yra neatpažįstama, o diagnozuojamos tik išplitusių, perisistuojančių organizme sukėlėjų sukeltos pasekmės.

Rūšys	Infekcijos mechanizmas	Liga
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Plinta tiesiogiai ar lytiniu būdu: pirminė infekcijos vieta dažniausiai yra akies ar šlapimo sistemos ir lytinių takų gleivinė.	Venerinė limfogranulioma (LGV) Trachoma, įskaitant naujagimių ir suaugusiųjų konjungtyvitą; gimdos kaklelio uždegimas, salpingitas, uretritas, epididimitas, proktitas ir naujagimių pneumonija
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Kvėpavimo takų gleivinės infiltracija.	Galimos kvėpavimo takų ligos, endokarditas, širdies vainikinių kraujagyslių liga
<i>Chlamydia psittaci</i>	Užkrėstų paukščių išmatų įkvėpimas; sąlytis su užkrėstų paukščių vidaus organais	Ornitozė (psitakozė)

Infekciją galima diagnozuoti

- ☐ mikroskopuojant: tepinėlius nudažius Gimzos metodu;
- ☐ polimerazės grandinės reakcijos (PCR) metodu;
- ☐ atliekant serologinius tyrimus:
 - randant antigenų imunofermentiniu tyrimo metodu (*ELISA*);
 - randant antikūnų imunofluorescentiniu (IF),
 - imunofermentiniais tyrimo metodais (*EIA*, *ELISA*).

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *Chlamydia pneumoniae* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas ELISA (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami išgrynintais *Chlamydia pneumoniae* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklininti antikūnai žmogaus IgG susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *Chlamydia pneumoniae* IgG antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

Novagnost® <i>C. pneumoniae</i> IgG:	1 x 96
Novagnost® <i>C. pneumoniae</i> IgG (testo plokštelė, padengta išgrynintais <i>C. pneumoniae</i> antigenais):	1
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
<i>C. pneumoniae</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>C. pneumoniae</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>C. pneumoniae</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
Buferis IgG-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis Novagnost linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais Novagnost linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietaj Novagost plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

Novagnost® C. pneumoniae IgG testo plokštelė: Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgG konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgG, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

C. pneumoniae kontrolinis serumas, teigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

C. pneumoniae ribinės vertės kontrolinis serumas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

C. pneumoniae kontrolinis serumas, neigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojimui nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. *Novagnost®* ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

C. pneumoniae IgG testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Butieliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
<i>Novagnost® C. pneumoniae</i> IgG testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
<i>C. pneumoniae</i> kontroliniai serumai neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C, saugant nuo	iki tinkamumo laiko pabaigos

		šviesos	
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *C. pneumoniae* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

- 6. Konjugato išpilstymas** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.
- 7. Konjugato inkubavimas:** inkubuokite 30 min. ($\pm$ 2 min.) +20 – +25° C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
- 8. Plovimas** Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.
- 9. Išpilstykite substratą:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.
- 10. Substrato inkubavimas:** Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo +20 iki +25° C), apsaugokite ją nuo šviesos.
- 11. Reakcijos sustabdymas:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
- 12. Matavimas:** Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

- 1. Mėginio praskiedimas:** Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 100µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
- 2. Testo atlikimo schema:** Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
- 3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete:** Į *C. pneumoniae* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juosteles) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 /BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39 +$ ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2– 4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10 = [\text{Novagnost[®] Units} = \text{U}]$

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)
Neigiamas serumas	20	0,41	7,2
Teigiamas serumas	24	1,37	4,3
Tiriant skirtingais metodais	n	Vidutinis (U)	CV (%)
Neigiamas serumas	12	9	10,6
Teigiamas serumas	12	32	5,2

Specifiškumas

Diagnosticinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra 91,7 proc.

Jautrumas

Diagnosticinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra 90,2 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.
6. *Chlamydia pneumoniae* antigenas, kuriuo padengtos plokštelės sudarytas iš elementariųjų kūnelių. Negalima atmesti *Chlamydia trachomatis* kryžminės reakcijos su serumais, kuriuose yra antikūnų LPD ir MOMP.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost® C. pneumoniae IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgG buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / nuo +20 iki +25°C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. KUO, C. C.; JACKSON, L. A.; CAMPBELL, L. A. AND GRAYSTON, T. J. (1995). CHLAMYDIA PNEUMONIAE (TWAR). CLIN. MICROBIOL. REV. 8, 551-561.
2. BOWMAN J. AND HAMMERSCHLAG M. R. (2002). CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND ATHEROSCLEROSIS: CRITICAL ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC METHODS AND RELEVANCE TO TREATMENT STUDIES. CLIN. MICROBIOL. REV. 15, 1-20.
3. SAIKKU P. (2000). CHLAMYDIA PNEUMONIAE IN ATHEROSCLEROSIS. J. INT. MED. 247, 391-396.
4. MAHONY, J. B. AND COOMBES (2001). CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND ATHEROSCLEROSIS: DOES THE EVIDENCE SUPPORT A CAUSAL OR CONTRIBUTORY ROLE? FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 197, 1-9.
5. TUUMINEN, T.; PALOMAKI, P. AND PAAVONEN, J. (2000) THE USE OF SEROLOGIC TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF CHLAMYDIAL INFECTIONS. J. MICROBIOL METHODS 42, 265-279.
6. INTERNETAS: WWW.CHLAMYDIAE.COM

Novagnost® Chlamydia pneumoniae IgM

CHLP/M

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Chlamydia pneumoniae* IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 psl.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių *Chlamydia pneumoniae* IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ar plazmoje (apdorotoje citratais). Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Chlamidijos yra nejudrios, gram-neigiamos tik ląstelių viduje augančios bakterijos, užkrėstų ląstelių citoplazmoje sudarančios charakteringus intarpus. Jie yra lengvai pastebimi šviesos mikroskopu. Žinomos trys žmonėms patogeniškos *Chlamydia* rūšys: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* (neseniai pavadinimas pakeistas į *Chlamydophila pneumoniae*) ir *Chlamydia psittaci*; viena rūšis yra patogeniška tik gyvūnams (*C. pecorum*). *Chlamydia trachomatis* yra labiausiai paplitęs lytiniu keliu plintančių infekcijų sukėlėjas visame pasaulyje (400 – 500 milijonų atvejų), infekcinių susirgimų skaičius nuolat didėja. Nėščiosios, užsikrėtusios *C. trachomatis*, šiomis bakterijomis gimdydamos gali užkrėsti naujagimį; naujagimiams gali išsivystyti konjungtyvitas ar pneumonija. Chlamidijų sukeltos infekcijos negydant liga gali komplikuotis lėtiniu salpingitu, kuris būti negimdinio nėštumo ar nevaisingumo priežastimi. Vyrams *C. trachomatis* yra pagrindinė negonokokinio uretrito priežastis. Sudėtinga su *Chlamydia* sukeltomis infekcijomis susijusi problema yra dažnai simptomų nesukelianti slapta ligos eiga, todėl infekcija gali būti lėtinių ligų išsivystymo priežastimi. Daugeliu atvejų pirminė infekcija yra neatpažįstama, o diagnozuojamos tik išplitusių, perisistuojančių organizme sukėlėjų sukeltos pasekmės.

Rūšys	Infekcijos mechanizmas	Liga
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Plinta tiesiogiai ar lytiniu būdu: pirminė infekcijos vieta dažniausiai yra akies ar šlapimo sistemos ir lytinių takų gleivinė.	Venerinė limfogranulioma (LGV) Trachoma, įskaitant naujagimių ir suaugusiųjų konjungtyvitą; gimdos kaklelio uždegimas, salpingitas, uretritas, epididimitas, proktitas ir naujagimių pneumonija
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Kvėpavimo takų gleivinės infiltracija.	Galimos kvėpavimo takų ligos, endokarditas, širdies vainikinių kraujagyslių liga
<i>Chlamydia psittaci</i>	Užkrėstų paukščių išmatų įkvėpimas; sąlytis su užkrėstų paukščių vidaus organais	Ornitozė (psitakozė)

Infekciją galima diagnozuoti

- ☐ mikroskopuojant: tepinėlius nudažius Gimzos metodu;
- ☐ polimerazės grandinės reakcijos (PCR) metodu;
- ☐ atliekant serologinius tyrimus:
 - randant antigenų imunofermentiniu tyrimo metodu (*ELISA*);
 - randant antikūnų imunofluorecentiniu (IF),
 - imunofermentiniais tyrimo metodais (*EIA*, *ELISA*).

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis IgM klasės antikūnų *Chlamydia pneumoniae* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas ELISA (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami išgrynintais *Chlamydia pneumoniae* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklininti antikūnai žmogaus IgM susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *Chlamydia pneumoniae* IgM antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

Novagnost® <i>C. pneumoniae</i> IgM:	1 x 96
Novagnost® <i>C. pneumoniae</i> IgM (testo plokštelė, padengta išgrynintais <i>C. pneumoniae</i> antigenais):	1
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas (gautas iš ožkų)*:	2 x 10 ml
<i>C. pneumoniae</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
<i>C. pneumoniae</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
<i>C. pneumoniae</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Buferis IgM-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis Novagnost linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais Novagnost linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietaj Novagnost plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

Novagnost® *C. pneumoniae* IgM testo plokštelė: Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgM konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų ožkos antikūnų žmogaus IgM, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų raudonų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

***C. pneumoniae* kontrolinis serumas, teigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

***C. pneumoniae* ribinės vertės kontrolinis serumas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

***C. pneumoniae* kontrolinis serumas, neigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgM mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, antikūnų žmogaus IgG (Rf absorbento), stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų žalių dažų, paruoštas naudoti. Papildomo Rf absorbcijos etapo nereikia, nes Rf absorbento yra buferiniame tirpale IgM mėginiui skiesti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojimui nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. TNovagnost® ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinus reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

C. pneumoniae IgM testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga reagentas /	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
Novagnost® C. pneumoniae IgM testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgM mėginio buferinis skiediklis:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
C. pneumoniae kontroliniai serumai (neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8 °C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgM mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *C. pneumoniae* IgM testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubavimas: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

- 6. Konjugato išpilstymas** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.
- 7. Konjugato inkubavimas:** inkubuokite 30 min. ($\pm$ 2 min.) +20 – +25° C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
- 8. Plovimas** Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.
- 9. Išpilstykite substratą:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.
- 10. Substrato inkubavimas:** Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo +20 iki +25° C), apsaugokite ją nuo šviesos.
- 11. Reakcijos sustabdymas:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
- 12. Matavimas:** Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

- 1. Mėginio praskiedimas:** Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgM mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
- 2. Testo atlikimo schema:** Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
- 3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete:** Į *C. pneumoniae* IgM testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostelės) reikia užpildyti vandeniu. *BEP®III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP®III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra panaudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP®2000/ BEP 2000 Advance®* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU naudojamas laikas / tūriai, tačiau *BEP®2000/ BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,39 + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38

Ribinė vertė = 0,38

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2– 4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

$$\frac{\text{Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė} \times 10}{\text{Ribinė vertė}} = [\text{Novagnost[®] vienetai} = \text{U}]$$

Pavyzdys:
$$\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetų)}$$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)
Teigiamas serumas	20	0,80	12,1
Teigiamas serumas	24	1,16	4,0
Tiriant skirtingais metodais	n	Vidutinis (U)	CV (%)
Teigiamas serumas	12	21,6	8,3

Specifiškumas

Diagnostinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Jautrumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnostinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra 83,3 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš gelto patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.
6. *Chlamydia pneumoniae* antigenas, kuriuo padengtos plokštelės sudarytas iš elementariųjų kūnelių. Negalima atmesti *Chlamydia trachomatis* kryžminės reakcijos su serumais, kuriuose yra antikūnų LPD ir MOMP.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost® C. pneumoniae IgM testo plokštelė:

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgM buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm$ 5' / 37° C $\pm$ 1° C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm$ 2' / 37° C $\pm$ +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. KUO, C. C.; JACKSON, L. A.; CAMPBELL, L. A. AND GRAYSTON, T. J. (1995). CHLAMYDIA PNEUMONIAE (TWAR). CLIN. MICROBIOL. REV. 8, 551-561.
2. BOWMAN J. AND HAMMERSCHLAG M. R. (2002). CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND ATHEROSCLEROSIS: CRITICAL ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC METHODS AND RELEVANCE TO TREATMENT STUDIES. CLIN. MICROBIOL. REV. 15, 1-20.
3. SAIKKU P. (2000). CHLAMYDIA PNEUMONIAE IN ATHEROSCLEROSIS. J. INT. MED. 247, 391-396.
4. MAHONY, J. B. AND COOMBES (2001). CHLAMYDIA PNEUMONIAE AND ATHEROSCLEROSIS: DOES THE EVIDENCE SUPPORT A CAUSAL OR CONTRIBUTORY ROLE? FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 197, 1-9.
5. TUUMINEN, T.; PALOMAKI, P. AND PAAVONEN, J. (2000) THE USE OF SEROLOGIC TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF CHLAMYDIAL INFECTIONS. J. MICROBIOL METHODS 42, 265-279.
6. INTERNETAS: WWW.CHLAMYDIAE.COM

Novagnost® EBV-VCA IgG

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *EBV-VCA* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 67 psl.

.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių EBV-VCA IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume.

Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Eipštein Baro virusas (EBV) yra herpes virusų (Gama pogrupio, DNR virusas 120-200 nm) šeimos narys. Virusas plačiai paplitęs visame pasaulyje ir daugelis žmonių juo užsikrečia gyvenimo cikle. Virusų paplitimo beveik neįmanoma sustabdyti dėl to kad daugelis žmonių virusą nešioja ir platina per visą gyvenimo ciklą. Naujagimiai virusu gali užsikrėsti tuoj pat kai tik sunyksta motinos antikūnų apsauga. Naujagimių infekcija beveik neturi simptomų. Infekcinė mononukleozė beveik visada nėra letali. Nėra žinomų asociacijų tarp aktyvios EBV infekcijos ir problemų nėštumo metu. Infekcinės mononukleozės simptomai paprastai išnyksta per 1 ar 2 mėn, EBV pasilieka gerklės arba kraujo ląstelėse visą gyvenimą. Periodiškai virusas gali reaktyvuotis. Reaktyvacija paprastai atsiranda be ligos požymių.

Rūšis	Liga	Infekcijos mechanizmas	Infekcijos mechanizmas
Epštein Bar virusas	Infekcinė mononukleozė	Karščiavimas, skaudanti gerklė, padidėję limfmazgiai	Žmogus žmogui transmisija EBV reikia artimo kontakto su infekuoto žmogaus seilėmis, tačiau virusas taip pat randamas ir sveikų žmonių seilėse

Viruso būvimą galima nustatyti:

- PCR
- Serologija: „mono spot“ testas, antikūnų nustatymas ELISA metodu

Optimali serologinių testų kombinacija susideda iš trijų markerių titravimo: IgM ir IgG prieš kapsidinį antigeną (VCA) ir antikūnius prieš EBV branduolio antigeną (EBNA). IgM prieš VCA atsiranda ankstyvoje infekcijoje ir pranyksta 4 – 12 savaitę. IgG prieš VCA atsiranda ūmioje fazėje, pikas 2-4 savaitės ir sunyksta lėtai ir egzistuoja visą gyvenimą.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *EBV-VCA* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas *ELISA* (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *EBV-VCA* sintetiniu antigenu (p18. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklinėti antikūnai žmogaus IgG susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksidą) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *anti-EBV-VCA* IgG antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti *ELISA* mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgG</i> :	1 x 96
<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgG</i> (testo plokštelė, padengta sintetiniu p18 peptidu):	1
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
Buferis IgG-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Sudėtis

***Novagnost*[®] *EBV-VCA IgG* testo plokštelė:** Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgG konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgG, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, teigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

***EBV-VCA* ribinės vertės kontrolinis serumas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, neigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojamą nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipetų antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. **Novagnost® ELISA** yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

EBV-VCA IgG testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	Per naktį
<i>Novagnost</i> [®] EBV-VCA IgG testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
EBV-VCA kontroliniai serumai neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius. Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdam t 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

- 6. Konjugato išpilstymas** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.
- 7. Konjugato inkubavimas:** inkubuokite 30 min. ($\pm$ 2 min.) +20 – +25° C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
- 8. Plovimas** Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.
- 9. Išpilstykite substratą:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.
- 10. Substrato inkubavimas:** Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo +20 iki +25° C), apsaugokite ją nuo šviesos.
- 11. Reakcijos sustabdymas:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
- 12. Matavimas:** Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

- 1. Mėginio praskiedimas:** Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
- 2. Testo atlikimo schema:** Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
- 3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete:** Į *EBV-VCA* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juosteles) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 /BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39 +$ ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10 = [\text{Novagnost[®] Units} = \text{U}]$

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SEROLOGIJA

Antikūniai EBV			Infekcijos stadija
VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG	
-	-	-	EBV neigiamas
-	+	+	Buvusi EBV infekcija
+	+-	-	EBV infekcija ankstyvi stadija
-+	+	-+	EBV infekcija pereinamas laikotarpis
-	+	+	EBV infekcija sveikimo laikotarpis
-+	+	+	EBV infekcija reaktyvacija

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Specifiškumas

Diagnostinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnostinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] EBV-VCA IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgG buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / nuo $+20$ iki $+25^{\circ}\text{C}$

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo $+20$ iki $+25^{\circ}\text{C}$ (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Novagnost® EBV-VCA IgM

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam EBV-VCA IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 71 psl.

.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių EBV-VCA IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume.

Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Eipštein Baro virusas (EBV) yra herpes virusų (Gama pogrupio, DNR virusas 120-200 nm) šeimos narys. Virusas plačiai paplitęs visame pasaulyje ir daugelis žmonių juo užsikrečia gyvenimo cikle. Virusų paplitimo beveik neįmanoma sustabdyti dėl to kad daugelis žmonių virusą nešioja ir platina per visą gyvenimo ciklą. Naujagimiai virusu gali užsikrėsti tuoj pat kai tik sunyksta motinos antikūnų apsauga. Naujagimių infekcija beveik neturi simptomų. Infekcinė mononukleozė beveik visada nėra letali. Nėra žinomų asociacijų tarp aktyvios EBV infekcijos ir problemų nėštumo metu. Infekcinės mononukleozės simptomai paprastai išnyksta per 1 ar 2 mėn, EBV pasilieka gerklės arba kraujo ląstelėse visą gyvenimą. Periodiškai virusas gali reaktyvuotis. Reaktyvacija paprastai atsiranda be ligos požymių.

Rūšis	Liga	Infekcijos mechanizmas	Infekcijos mechanizmas
Epštein Bar virusas	Infekcinė mononukleozė	Karščiavimas, skaudanti gerklė, padidėję limfmazgiai	Žmogus žmogui transmisija EBV reikia artimo kontakto su infekuoto žmogaus seilėmis, tačiau virusas taip pat randamas ir sveikų žmonių seilėse

Viruso būvimą galima nustatyti:

- PCR
- Serologija: „mono spot“ testas, antikūnų nustatymas ELISA metodu

Optimali serologinių testų kombinacija susideda iš trijų markerių titravimo: IgM ir IgG prieš kapsidinį antigeną (VCA) ir antikūnius prieš EBV branduolio antigeną (EBNA). IgM prieš VCA atsiranda ankstyvoje infekcijoje ir pranyksta 4 – 12 savaitę. IgG prieš VCA atsiranda ūmioje fazėje, pika 2-4 savaitės ir sunyksta lėtai ir egzistuoja visą gyvenimą.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *EBV-VCA* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas *ELISA* (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *EBV-VCA* sintetiniu antigenu (p18). Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklinėti antikūnai žmogaus IgM susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *anti-EBV-VCA* IgM antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti *ELISA* mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgM</i> :	1 x 96
<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgM</i> (testo plokštelė, padengta sintetiniu p18 peptidu):	1
Antikūnų žmogaus IgMkonjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
Buferis IgM-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Sudėtis

***Novagnost*[®] *EBV-VCA IgM* testo plokštelė:** Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgM konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgM, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, teigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

***EBV-VCA* ribinės vertės kontrolinis serumas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, neigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojimui nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokios struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipėčių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. **Novagnost® ELISA** yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

EBV-VCA IgM testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	Per naktį
<i>Novagnost</i> [®] EBV-VCA IgM testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgM mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
EBV-VCA kontroliniai serumai neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 + 19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius. Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdam t 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA IgM* testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.
4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl antikūnų žmogaus IgM konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. ($\pm$ 2 min.) +20 – +25° C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo +20 iki +25° C), apsaugokite ją nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į EBV-VCA IgM testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juosteles) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 /BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39 +$ ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10 = [\text{Novagnost[®] Units} = \text{U}]$

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SEROLOGIJA

Antikūniai EBV			Infekcijos stadija
VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG	
-	-	-	EBV neigiamas
-	+	+	Buvusi EBV infekcija
+	+-	-	EBV infekcija ankstyvi stadija
-+	+	-+	EBV infekcija pereinamas laikotarpis
-	+	+	EBV infekcija sveikimo laikotarpis
-+	+	+	EBV infekcija reaktyvacija

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Specifiškumas

Diagnostinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra 96,3 proc.

Jautrumas

Diagnostinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra > 93,9 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

KRYŽMINĖS REAKCIJOS

Edenovirusas	neig
CMV	neig
Echinokokas	neig
HBV	neig
Gripas A	neig
Gripas B	neig
Leptospira	neig
Picorna	neig
Q-karštinė	neig
Raudoniukė	neig
Toksoplazma	neig

VZV	neig
Lues	neig
RSV	neig

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] **EBV-VCA** IgM testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgG buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm$ 5' / 37° C $\pm$ 1° C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm$ 2' / nuo +20 iki +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

SIEMENS

Enzygnost® Anti-Helicobacter pylori II/IgA

Imunofermentinis metodas kokybiniam aptikimui ir kiekybiniam specifinių *Helicobacter pylori* IgA antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume ir plazmoje.

Anglų kalba: nuo 2 iki 12 puslapio

Procedūros santrauka pateikiama 12 psl.

Literatūros sąrašas pateikiamas 68 psl.

Enzygnost® Anti-Helicobacter pylori II/IgA

Atkreipkite dėmesį į nuspalvintas teksto dalis – čia pateikiama atnaujinta informacija, palyginti su 2008 m. balandžio mėn. leidimu.

Naudojimo paskirtis

Imunofermentinis metodas kokybiniam aptikimui ir kiekybiniam specifinių *Helicobacter pylori* IgA antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume ir plazmoje.

Imunofermentinį testą galima atlikti naudojant ELISA analizatorius, BEP® III sistemą, BEP® 2000 sistemą arba BEP 2000 Advance® sistemą. Taip pat testą galima atlikti nenaudojant automatizuotų prietaisų.

Santrauka ir paaiškinimai

Warren ir Marshall 1983 m. pirmą kartą pavyko iš paciento skrandžio paimtos biopsinės medžiagos išauginti įviją gram-neigiamą bakteriją.¹ Pradžioje sukėlėjas buvo pavadintas *Campylobacter pyloridis*, o vėliau – *Campylobacter pylori*. 1989 m. bakterijos taksonominė padėtis buvo patikslinta ir ji pavadinta *Helicobacter pylori*.²

Keliuose iki dabar atliktuose tyrimuose buvo nustatyta glaudi koreliacija tarp gastrito bei peptinės opos ir skrandžio gleivinės infekcijos, sukeltos *H. pylori*.^{3, 4} *H. pylori* infekcija turi būti laikoma skrandžio karcinomos išsivystymo rizikos veiksniu.⁵ Kultūroje sukėlėją aptikti yra nelengva, tačiau *H. pylori* galima aptikti skrandžio biopsijos mėginiuose panaudojant specialius dažymo metodus.⁶ *H. pylori* būdintas didelis ureazės aktyvumas. Ši savybė suteikia galimybių pritaikyti diagnostinę procedūrą, per kurią pacientas, nurijęs izotopu pažymėto šlapalo, išskvepia atitinkamai pažymėto CO₂, kurį galima aptikti masės spektrometrijos metodu.^{7, 8}

Pacientams, užsikrėtusiems *H. pylori* infekcijomis, randama su *H. pylori* reaguojančių antikūnų,^{9, 10} kurių kiekį serume galima nustatyti imunofermentiniu metodu. Kadangi liga yra lėtinė, sukėlėjui specifinių IgG arba IgA antikūnų nustatymas turi didelę klinikinę vertę. Remiantis šiuo metu turimomis žiniomis, sukėlėjui specifinių IgM antikūnų nustatymas nėra toks svarbus.¹¹

Nustatyta išskirtinė glaudi koreliacija tarp dvylikapirštės žarnos opų ir vadinamojo 1 tipo *H. pylori* padermių, kurios išskiria patogeniškumo veiksnius – „vakuolizuojantį toksiną“ (VacA) ir „su citotoksinu susijusį glikoproteiną A“ (CagA).¹²

Neseniai paskelbtose mokslinėse publikacijose nurodoma, kad gydymo eigą galima sekti ELISA analizatoriumi atliekant titrų testus.^{13, 14}

Metodo principas

Tiriamajame mėginyje esantys specifiniai *H. pylori* IgA antikūnai susiriša su testo plokštelės reakcijos šulinėliuose esančiais antigenais. Antikūnų žmogaus IgA/POD konjugatas susijungia su šiais specifiniais antikūnais. Konjugate esantis fermentas pakeičia chromogenino darbinio tirpalo spalvą ir jis pamėlynuoja. Reakcija sustabdoma pridėjus reakciją stabdančio POD tirpalo, kuris spalvą pakeičia į geltoną.

Susidariusios geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *H. pylori* IgA antikūnų kiekiui. Perskaičiavimas į Enzygnost® vienetus (U/ml) atliekamas taikant skaičiavimo α-metodą.¹⁵

Reagentai Simboliai

[MTP]	Pateikiamos medžiagos <i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>Helicobacter pylori</i> II/IgA 1 x 96
[REFER P/P]	<i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>H. pylori</i> II/IgA testo plokštelė 1 vnt.
[REFER N/N]	Anti- <i>H. pylori</i> referentinis P/P 0,3 ml
[DILUENT]	Anti- <i>H. pylori</i> referentinis N/N 0,3 ml
[CONJUGATE ANTI-A]	Buferinis tirpalas mėginiui POD 2 x 50 ml
[MICROBIOL A]	Antikūnų žmogaus IgA/POD konjugatas (<i>H. pylori</i>) 1,0 ml
	Buferinis tirpalas konjugatui, mikrobiologinis 2 x 12,5 ml
	Polietileno maišelis, 1 vnt.
	Verčių brūkšninių kodų lentelė, 1 vnt.
	Naudojimo instrukcijos, 1 vnt.

Testo plokštelė, konjugatas, antikūnų *H.pylori* referentinis P/P tirpalas ir antikūnų *H.pylori* referentinis N/N tirpalas, ant pakuotės pažymėti vienodu 6 skaičių partijos numeriu ir atitinkamai įrašyti į pridedamas verčių brūkšninių kodų lenteles, turi būti naudojami kartu. Atliekant kokybinius ir kiekybinius testus visos medžiagos turi būti naudojamos tik iš vieno rinkinio.

Papildomos reikalingos bet netiekiamos medžiagos

Papildomi reagentai *Enzygnost*[®]/TMB ([REF] OUVP).

Galima naudoti tik tų gamybos partijų reagentus Chromogen TMB ir buferis / substratas TMB, kurios yra nurodytos Papildomų reagentų rinkinyje OUVP. Partijų numeriai yra šešiaženkliai partijų numeriai, nurodyti ant pakuotės.

Sudėtis

***Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II/IgA testo plokštelė:** mikrotitravimo plokštelė, padengta inaktyvuotais *H. pylori* antigenais (detergentų pagalba gautas ekstraktas iš CagA ir VacA išskiriančios padermės).

Antikūnų žmogaus IgA/POD konjugatas (*H. pylori*): Ožkos antikūnų žmogaus IgA F(ab)' frakcija, konjuuguota su peroksidaze, Tris/HCl buferiniame tirpale (0,05 mol/l). Konjugatas yra geltonos spalvos.

Dažai: tartrazinas (440 mg/l).

Konservantas: fenolis (1 g/l).

Antikūnų *H. pylori* referentinis P/P: Žmogaus serumas, kuriame yra IgG ir IgA klasių antikūnų *H. pylori* antigenams.

Nominalios vertės, kurių reikia vertinimui, bei jų viršutinė ir apatinė riba nurodytos verčių brūkšninių kodų lentelėje.

Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Antikūnų *H. pylori* referentinis N/N: Žmogaus serumas, kuriame nėra antikūnų *H. pylori* antigenams.

Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Konjugato buferinis tirpalas, mikrobiologinis: EDTA (37 mg/l) fosfatinio buferio tirpale (0,01 mol/l) su *Tetronic*[®] (2 %) ir BSA (1 %), pH vertė: 7,0 – 7,4. Skirtas naudoti ruošiant konjugato darbinį praskiestą tirpalą. Konservantai: gentamicinas (100 mg/l), 5-chloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (6 mg/l), 2-metil-4-izotiazolin-3-onas (2 mg/l).

Buferinis tirpalas POD mėginiui: Šis Tris/HCl tirpalas (0,3 mol/l) turi būti naudojamas praskiesti tiriamuosius mėginius ir referentinius mėginius. Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.
2. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos.
3. Kiekvienas donoras ar donorinė medžiaga buvo patikrinta dėl 1 ir 2 tipo žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV), hepatito B viruso (HBV) ir hepatito C viruso (HCV), tyrimams atlikti naudojant testus, atitinkančius ES direktyvą dėl *in vitro* diagnostikos, ar Maisto ir vaistų agentūros (FDA) patvirtintus testus; testų rezultatai buvo neigiami. Kadangi nei vienas žinomas testas negali suteikti absoliučios garantijos, kad infekcijos sukėlėjų nėra, su visais iš žmogaus audinių pagamintais produktais reikia dirbti taikant atitinkamas atsargumo priemones.
4. Patariama atliekant visas testo procedūras mūvėti apsaugines pirštines. Prašome laikytis gamintojo pateiktų rekomendacijų dėl pirštinių ir naudojamų medžiagų suderinamumo,
5. Tvarkant atliekas rekomenduojama kietas užterštas medžiagas autoklavuoti mažiausiai vieną valandą +121° C temperatūroje. Visi surinkti skysčiai turi būti supilami į dvi talpyklas, sujungtas nuosekliai. Kiekvienoje iš jų turi būti dezinfekcinės medžiagos, tinkančios pašalinti žmonių patogenų kenksmingumą. Būtina naudoti gamintojo nurodytas koncentracijas ir išlaukti nurodytą poveikio laiką.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdant atlikti testą visus reagentus ir tiriamuosius mėginius atsineškite į patalpą, kurios temperatūra yra nuo +18 iki +25° C. Nuo testo plokštelių folijos lapelių šiame etape nenuimkite. Prieš pradėdami testo procedūras nuo laikiklio nuimkite nereikalingas juosteles ir padėkite į užklijuojamą polietileno maišelį, kad galėtumėte panaudoti vėliau (žr. 1 lentelę). Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Praskieskite antikūnų žmogaus IgA/POD konjugatą (H. pylori) 1 + 50 su konjugato buferiniu tirpalu mikrobiologijai, pvz., vienai testo plokštei 250 μl konjugato supilkite į buteliuką su 12,5 ml konjugato buferinio tirpalo mikrobiologijai. Švelniai supurtykite, kad susimaišytų.

Skiedžiant mėginius 50 ml buferinio tirpalo POD mėginiams galima nuspalvinti mėlynai violetine spalva pridėdant 2,5 ml mėlyno spalvą suteikiančio tirpalo *Enzygost*[®] testams (iš Papildomų reagentų *Enzygnost*[®]/ TMB rinkinio). Švelniai supurtykite, kad susimaišytų. Nedidelis kiekis netirpių nuosėdų buferiniame tirpale POD mėginiams problemų nesukelia.

Kiekvienai plokštei 20 ml plovimo tirpalo POD (papildomi reagentai *Enzygnost*[®]/TMB) praskieskite 4 distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu iki 400 ml.

Kiekvienai plokštei 1 ml Chromogen TMB tirpalo praskieskite 10 ml buferinio tirpalo / substrato TMB (chromogeno darbinis tirpalas), esančiu Papildomų reagentų *Enzygnost*[®]/TMB rinkinyje; tam panaudokite pridėdamą plastikinį buteliuką.

Laikykite saugodami nuo šviesos. Panaudoję buteliuką kruopščiai praskalaukite distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu.

Dėl techninių priežasčių (perpildymas) Chromogen TMB buteliuko turinio neleidžiama supilti į buferio / substrato TMB buteliuką.

Laikymas ir stabilumas

Visus neatidarytus testo rinkinio komponentus laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje, galima naudoti iki ant etiketės nurodyto tinkamumo laiko pabaigos.

Išsamūs duomenys apie atidarytų ar praskiestų reagentų stabilumą ir laikymą pateikti priede, 1 lentelėje.

Reikalinga įranga

BEP[®] III: Skirta automatiškai atlikti testą ir jį įvertinti po to, kai mėginiai išpilstyti.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Stūmoklinio tipo, fiksuoto ar kintamo tūrio, vienkanalės ar daugiakanalės reguliuojamo tūrio pipetės.

Jeigu testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų, reikia tokios papildomos įrangos:

Inkubatorius: uždaroma termostatinė vandens vonia ($+37 \pm 1^\circ \text{C}$) ar panašus inkubavimo metodas.

Plovimo prietaisas: mikrotitravimo plokštelių plovimo prietaisas.

Fotometras: mikrotitravimo plokštelėms tinkantis fotometras, matuojantis 450 nm ilgio bangomis, referentinis bangos ilgis 650 nm (nuo 615 nm iki 690 nm atitinkamai).

Kiekybiniam testo įvertinimui: kišeninis skaičiuotuvas su eksponentine ir logaritmine funkcija.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tinkama tiriamoji medžiaga yra iš tiriamųjų asmenų paimti mėginiai (žmogaus serumas ar EDTA/heparinu / citratu apdorota plazma), gauti įprastais laboratoriniais metodais. Mėginius galima laikyti ne ilgiau kaip 3 dienas $+2 - +8^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Jeigu mėginius reikia laikyti ilgiau, jie turi būti užšaldomi.

Procedūra

Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų

1. Mėginių praskiedimas: Praskieskite visus mėginius, antikūnų *H. pylori* referentinį P/P ir antikūnų *H. pylori* referentinį N/N mėginius santykiu 1+20 panaudodami mėlynai-violetinės spalvos buferinį tirpalą POD mėginimas, pvz., 20 mėginio pipete sulašindami į mėgintuvėlį skiedimui ir pridėdami 400 μl buferinio tirpalo POD mėginiams. Švelniai supurtykite, kad turinys gerai susimaišytų. Praskiesti mėginiai gali būti laikomi sandariai uždaryti $+2$ to $+8^{\circ}\text{C}$ talpyklėse, pasižyminčiose žema baltymus surišančia geba.
2. Testo atlikimo schema: Reikalingas mikrotitravimo plokštelių šulinėlių skaičius paskaičiuojamas atsižvelgiant į mėginių skaičių, pridėtant po du šulinėlius kiekvienam antikūnų *H. pylori* referentiniam P/P ir antikūnų *H. pylori* referentiniam N/N mėginiui.
3. Mėginių išpilstymas: Į Enzygnost[®] Anti-*H. pylori* II/IgA testo plokštelės pirmosios juostelės pirmuosius du šulinėlius sulašinkite po 100 antikūnų *H. pylori* referentinio N/N mėginio, praskiesto, kaip nurodyta 1 etape, o sekantį šulinėlį – antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginio. Tada į kiekvieną sekantį juostelių šulinėlį sulašinkite po 100 μl praskiestų mėginių. Į paskutinį testo juostelės ar mikrotitravimo plokštelės šulinėlį įlašinkite 100 μl antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginio.

Svarbu: Neleidžiama teigiamos kontrolės tirpalo sulašinti pradžioje iš karto į abu tiriamųjų mėginių serijos pradžioje ir pabaigoje esančius šulinėlius, o vėliau „mėginius sulašinti tarp jų“.

Kiekvienam mėginiui lašinti reikia naudoti naują pipetės antgalį. Į testo plokštelę mėginius reikia sulašinti per 15 minučių. Naudojant 8 kanalų pipetę praskiestų mėginių lašinimo į testo plokštelę procedūra atliekama paprasčiau ir greičiau. Sulašinę mėginius, užklijuokite testo plokštelę folija ir nedelsdami (ne vėliau kaip per 15 minučių) idėkite į inkubatorių.

4. Inkubavimas: Inkubuokite $+37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 30 ± 2 minučių, o tada nedelsdami pradėkite plovimo etapą.

5. Plovimas: Nuimkite foliją ir iš visų šulinėlių nusiurbkite skystį. Į kiekvieną šulinėlį sulašinkite maždaug 0,3 ml praskiesto plovimo tirpalo POD, nusiurbkite skystį iš visų plokštelės šulinėlių ir pakartokite plovimo procedūrą dar 3 kartus. Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 μl antikūnų žmogaus IgA / POD konjugato (*H. pylori*). Uždenkite plokštelę nauju folijos lapeliu ir nedelsdami idėkite į inkubatorių.

7. Inkubavimas: Inkubuokite $+37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 30 ± 2 minučių, o tada nedelsdami pradėkite plovimo etapą.

8. Plovimas: Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 chromogeno darbinio tirpalo ir uždenkite plokštelę nauju folijos lapeliu.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami inkubuokite $+18 - +25^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, saugodami nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Nuimkite foliją. Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite reagentą stabdančio POD tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Per valandą įvertinkite reakcijos testo plokštelėje rezultatus, matavimus atlikdami 450 nm ilgio bangomis. Rekomenduojamas referentinis bangos ilgis yra 650 nm, arba, kai tinka nuo 615 iki 690 nm.

Procedūra naudojant BEP® III sistemą

Naudojant BEP® III, testo plokšteles reikia paruošti į jas išpilstant tiriamuosius mėginius (1– 3 etapai, aprašyti skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“).

Iš karto po to neuždengtos testo plokštelės, t. y., neuždengtos folija, dedamos į BEP® III.

Visus kitus procedūros etapus automatiškai atlieka prietaisas (žr. BEP® III prietaiso naudojimo instrukciją). BEP® III prietaiso programinėje įrangoje nustatyti inkubavimo laikai dėl techninių priežasčių (sistemos greičio) gali skirtis nuo aprašytųjų skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“, tačiau BEP® III sistema yra patikrinta ir tinka dirbti su Enzygnost® produktais.

Procedūra naudojant BEP® 2000 sistemą

Analizatorius automatiškai išpildo mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. BEP® 2000 naudojimo vadovą).

BEP® 2000 prietaiso programinėje įrangoje nustatyti inkubavimo laikai ir mėginių maišymo režimas gali skirtis nuo aprašytųjų skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“, tačiau BEP® 2000 sistema yra patikrinta ir tinka dirbti su Enzygnost® produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Patikrinimo kriterijai

Kad testą būtų galima vertinti, jis turi atitikti tokius kriterijus:

1. Antikūnų *H. pylori* referentinis N/N: $A_{450nm} \leq 0,250$ (kiekvienos atskiros vertės);

2. Antikūnų *H. pylori* referentinis P/P:

Kiekviena atskira vertė turi patekti į intervalą tarp viršutinės ir apatinės ribos, nurodytos atitinkamoje verčių brūkšninių kodų lentelėje:

apatinė riba $\leq A_{\text{antikūnų } H. pylori \text{ referentinis P/P}} \leq$ viršutinė riba.

Be to, kiekviena atskira vertė (antikūnų *H. pylori* referentio P/P mėginių serijos arba testo plokštelės pradžioje ir pabaigoje) tarpusavyje negali skirti daugiau kaip ± 20 proc. nuo paskaičiuotos vidutinės šių verčių vertės.

Jeigu šios sąlygos netenkinamos, testo vertinti negalima. Matavimus reikia pakartoti ištyrus klaidos priežastis.

Rezultatų apskaičiavimas

Naudojant BEP® 2000 ir BEP® III rezultatai apskaičiuojami automatiškai.. Prašome vadovautis atitinkamu naudojimo vadovu. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Matavimų koregavimas

Norint pasiekti geriausią rezultatų atkartojamumą, matavimus **reikia koreguoti**, tai taikytina **kiekybiniam įvertinimui**, kuris atliekamas α -metodu, ir **kokybiniam** testo įvertinimui.

Pirmiausia apskaičiuokite vidutinę referentinio P/P absorbcijos (A) vertę.

Tada apskaičiuojamas korekcijos koeficientas – nominaliąją vertę, nurodytą verčių brūkšninių kodų lentelėje, padalinant iš apskaičiuotos vidutinės referentinio P/P absorbcijos vertės:

A nominalioji vertė

Korekcijos koeficientas• = _____

Vidutinė A vertė_{referentinis P/P}

• Mėginių absorbcijos vertė dauginama iš šio koeficiento.

Pavyzdys pateikiamas skyrelyje „Kiekybinis įvertinimas“

Kokybinis įvertinimas

Kokybiniam vertinimui taikomi tokie kriterijai:

Antikūnai *Helicobacter pylori*/IgA **neigiamas** $A_{\text{mėginio}} < 0,400$ (ribinė vertė)

Antikūnai *Helicobacter pylori*/IgA **teigiamas** $A_{\text{mėginio}} \geq 0,400$.

Jeigu rezultatas yra labai artimas ribinei vertei, prašome vadovautis nurodymais, pateiktais skyrelio „Specialios testo charakteristikos“ paantraštėje „Matavimo intervalas“.

Kiekybinis įvertinimas taikant α -metodą

Mėginiai, kuriuose IgA antikūnų aktyvumas yra didesnis už ribinę vertę, gali būti įvertinti kiekybiškai taikant α -metodą.

Skaičiavimams nenaudokite:

- (A) koreguotų rezultatų $<$ už ribinę vertę;
- (A) nekoreguotų rezultatų $> 2,5$.

Mėginiai, kurių absorbcijos reikšmė (nekoreguota) yra didesnė kaip 2,5 turi būti tiriami praskiesti 1+209, kad vertinimas būtų teisingas.

$$\text{Log}_{10} \text{ U/mL} = \alpha \times \text{A}^\beta$$

Pavyzdys:

Absorbcijos vertės:	Kišeninis skaičiuotuvas:
Antikūnų <i>H. pylori</i> referentinis P/P	
bandinių serijos pradžioje 1,374 A	
bandinių serijos pabaigoje 1,188 A	
Vidutinė vertė 1,281 A	
Nominalioji vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 1,024 A	
Korekcijos koeficientas (žr. lygtį) 0,799	
Mėginio testo rezultatas 1,778 A	
Mėginio testo rezultatas koreguotas 1,421 A	Įvedamas skaičius 1,421 Nuspauskite klavišą X^y
β vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 0,4016	Įvedamas skaičius 0,4016 Nuspauskite klavišą = Nuspauskite klavišą x
α vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 1,6841	Įvedamas skaičius 1,6841
Log ₁₀ U/ml 1,9393	Nuspauskite klavišą = Nuspauskite klavišą INV ir log arba 10^x
Rezultatas 87,0 U/ml	

Vertes galima atsekti *Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH* vidaus standarte.

Neigiamas testo rezultatas rodo, kad IgA antikūnų *H. pylori* mėginyje nėra, arba jų koncentracija yra tokia maža, kokios atliekant testą nustatyti neįmanoma. Jeigu atlikus abu testus (IgG ir IgA antikūnams aptikti) testo rezultatas yra neigiamas, tai reiškia, kad specifinių *H. pylori* antikūnų aptikti neįmanoma.

Reikšmingai pacientų daliai (maždaug 2 – 7 proc.), IgG antikūnų testo rezultatas gali būti neigiamas, nepaisant akivaizdžios infekcijos, nors tuo pat metu specifinių *H. pylori* IgA klasės antikūnų gali būti randama.^{13, 17}

Todėl turėtų būti laikomasi pagrindinio principo – lygiagrečiai reikia atlikti abiejų klasių antikūnų testus. Be to IgG arba IgA antikūnai, specifiniai *H. pylori*, pasižymi skirtinga kinetika paskyrus gydymą antibiotikais, taigi, juos reikia lygiagrečiai tirti stebint gydymą.

Procedūros ribojimai

1. Krešėjimą slopinantys preparatai, pavyzdžiui, EDTA ar heparinas testo rezultatams įtakos neturi.
2. Lipeminiai ar hemoliziniai mėginiai, bei mėginiai, kuriuose yra reumatoidinio veiksnio testo atlikti netrukdo.
3. Testas buvo atliktas su mėginiais, kuriuose buvo IgM antikūnų Epštein–Baro virusui, IgM antikūnų HSV ar IgM antikūnų raudonukės virusui. Tiriant šiuos mėginius jokios įtakos testo rezultatams nebuvo nustatyta.
4. Tiriant karščiu apdorotus mėginius (30 minučių, +56° C temperatūroje) sąveikos nepastebėta.
5. Negalima naudoti ne visiškai sukrešėjusio serumo ar mikroorganizmais užterštų mėginių. Bet kokios mėginiuose esančios dalelės (pvz., fibrino krešuliai, eritrocitai) prieš atliekant testą iš mėginio turi būti pašalintos.
6. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
7. Būtina vengti buferinio tirpalo / substrato YMB, darbinio chromogeno tirpalo ir reakcijos sustabdymo POD tirpalo sąveikos su sunkiųjų metalų jonais ar oksiduojančiomis medžiagomis (nenaudokite pipečių, kuriose yra metalinių detalių, tiesiogiai susiliečiančių su skysčiu). Substrato reakcijos etapų negalima atlikti ten, kur greta yra dezinfekcinių medžiagų, kurių sudėtyje yra hipochlorito. Jeigu darbinis chromogeno tirpalas savaime pamėlynavo prieš jį sulašinant į plokštelę, tai rodo, kad tirpalas yra užterštas; tokiais atvejais švariame inde paruoškite naują tirpalą. Reikia vengti pirmiau išvardytų tirpalų patekimo ant odos.
8. Jeigu mėginiai reaguoja labai intensyviai, stabdant reakciją dažai gali precipituoti. Fotometriniam įvertinimui tai netrukdo.
9. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
10. Nedidelis kiekis netirpių nuosėdų buferiniame tirpale POD mėginiams problemų nesukelia.
11. *Enzygnost® Anti-Helicobacter pylori II/IgA* turi būti naudojamas tik pacientams, turintiems medicininio pobūdžio nusiskundimų arba patiriantiems atitinkamų skrandžio – žarnyno ligos simptomų, tačiau ne simptomų nepatiriantiems pacientams.
12. *Siemens* patikrino šiuos reagentus su įvairiais analizatoriais, kad produktas būtų kiek įmanoma veiksmingesnis ir atitiktų jam taikytinas specifikacijas. *Siemens* nepritaria vartotojų sugalvotiems pakeitimams, nes jie gali turėti įtakos sistemos charakteristikoms ir testo rezultatams. Už šių nurodymų pakeitimų įteisinimą ar reagentų arba analizatorių, neįrašytų į *Siemens* aprašus ar neišvardytų šiuose nurodymuose, naudojimą yra atsakingas naudotojas.
13. Šio testo rezultatus visada reikia vertinti atsižvelgiant į paciento medicininę istoriją, klinikinius požymius ir kitus duomenis.

Laukiamos vertės

Asmenų, su teigiamais serologiniais *H. pylori* požymiais paplitimas yra labai susijęs su amžiumi. Kaip taisyklė, bakterijų paplitimas tarp vaikų, gyvenančių išsivysčiusiose valstybėse, kuriose taikomi aukšti higienos reikalavimai, yra mažesnis kaip 10 proc., todėl teigiami *H. pylori* testo rezultatai su didele tikimybe leidžia įtarti užsikrėtimą sukėlėju. Asmenų, kurių organizme randama antikūnų, skaičius didėja su amžiumi; tarp vyresnių kaip 30 metų amžiaus pacientų užsikrėtusiųjų bakterijomis dalis (%) apytiksliai koreliuoja su amžiumi metais. Bakterijų paplitimo lygis normalioje besivystančių šalių populiacijoje yra gerokai didesnis nei Centrinėje Europoje ar Šiaurės Amerikoje.¹⁸

Specialios testo charakteristikos

Matavimo intervalas

Ribinė testo vertė atitinka 10 U/ml reikšmę, taigi, bet koks rezultatas ≥ 10 U/ml turi būti laikomas teigiamu. Dėl antigenų panašumo su kitomis gram-neigiamomis bakterijomis, kartais galima stebėti nespecifinių kryžminių reakcijų. Dėl šios priežasties ir dėl riboto mėginių, kurių tyrimo rezultatas

yra artimas ribinei vertei, rezultatų atkartojamumo, rezultato nuo 10 iki 15 U/ml negalima laikyti patikimai teigiamu. Mėginiai, kuriuos ištyrus kelis kartus gaunami nevienareikšmiai rezultatai, turi būti ištirti ir įvertinti kaip teigiami ar neigiami taikant papildomus metodus, pavyzdžiui, išskvepiamo oro ^{13}C testą.

Jautrumas ir specifiškumas (suaugusiųjų populiacija, 1-asis tyrimas)

Šiame tyrime buvo ištirti 461 serumo mėginys, paimtas ir pacientų, kuriems liga buvo diagnozuota remiantis būdingais klinikiniais požymiais. Paciento būklė buvo įvertinama remiantis turimais endoskopijos duomenimis (sukėlėjo

kultūra, histologinis įvertinimas, įskaitant dažytų bakterijų tyrimą) ir serologiniais duomenimis (testas imunofermentiniu metodu, *Western Blot* metodu). Remiantis tokiu būdu atliktu įvertinimu 80 pacientų buvo priskirta *H. pylori* neužsikrėtusių grupei ir 381 pacientas buvo priskirtas *H. pylori* užsikrėtusių grupei.

Ištyrus 381 užsikrėtusiųjų pacientų mėginius buvo gauti tokie **jautrumo duomenys**:

Enzygnost® Anti-*H. pylori* II (IgG, IgA) jautrumas

Simptomas	Mėginių skaičius n (%)	IgG-teigiamas n (%)	IgA teigiamas n (%)	IgG ir / arba IgA- teigiamas n (%)
Skrandžio vėžys	87 (100)	78 (89,7)	66 (75,9)	82 (94,3)
MALT limfoma	88 (100)	80 (90,9)	70 (79,6)	81 (92,0)
Dvylikapirštės žarnos opa	109 (100)	105 (96,3)	100 (91,7)	108 (99,1)
Skrandžio opa	45 (100)	44 (97,8)	43 (95,6)	45 (100)
Kontrolinė grupė ••	52 (100)	49 (94,2)	45 (86,5)	50 (96,1)
Iš viso:	381 (100)	356 (93,4)	324 (85,0)	366 (96,1)

•• Kontrolinė pacientų grupė (pvz., sergančių gastritu), kurioje buvo rasta ligos endoskopinių požymių.

Panašūs **bendro jautrumo** rezultatai visose pacientų grupėse buvo gauti 96,8 proc. atvejų tyrimui naudojant komercinį IgG-EIA rinkinį (gamintojas A, tirti tik 377 mėginiai), ir 80,6 proc. atvejų naudojant kitą IgG-EIA rinkinį (gamintojas B). Bendro IgG + IgA jautrumo rezultatai su B gamintojo rinkiniu buvo 84,0 proc. (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

80 neužsikrėtusių asmenų mėginių **bendras specifiškumas** buvo 98,8 proc. testą atliekant su *Enzygnost®* Anti-*H. pylori* II/IgG, 73,1 proc. – su gamintojo A rinkiniu (tirti tik 78 mėginiai) ir 100 proc. su gamintojo B rinkiniu. Atitinkamos IgA vertės buvo 100 proc. testą atliekant su *Enzygnost®* ir 98,8 proc. su gamintojo B rinkiniu. Bendro IgG + IgA specifiškumo vertė buvo 98,8 proc. testą atliekant su gamintojo B rinkiniu ir su *Enzygnost®* (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

Jautrumas ir specifiškumas (vaikų populiacija, 2-asis tyrimas)

Antrajame tyrime buvo ištirti 169 serumo mėginiai, paimti iš vaikų, kurių užsikrėtimas *H. pylori* buvo nustatytas atliekant iškvepiamo oro ¹³C testą. Remiantis tokiu būdu atliktu įvertinimu 120 pacientų buvo priskirta *H. pylori* neužsikrėtusių grupei ir 49 pacientai buvo priskirti *H. pylori* užsikrėtusių grupei.

Ištyrus 49 užsikrėtusiųjų pacientų mėginius buvo gauti tokie *Enzygnost®* Anti-*H. pylori* II **jautrumo duomenys**: IgG 85,7 proc., IgA 42,9 proc. Palyginami testų rezultatai buvo gauti 87,8 proc. atvejų naudojant A gamintojo komercinį IgG EIA rinkinį ir 79,6 proc. atvejų naudojant kitą IgG EIA rinkinį (gamintojas B). Naudojant gamintojo B rinkinį IgA jautrumas buvo tik 24,5 proc. Bendro IgG + IgA jautrumo vertės buvo 87,8 proc. testą atliekant su *Enzygnost®* ir 81,6 proc. su gamintojo B EIA rinkiniu (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

Atmetus užsikrėtusių asmenų mėginius, su *Enzygnost®* Anti-*H. pylori* II /IgG ištyrus 120 *H. pylori* neigiamų vaikų serumus buvo apskaičiuotas 98,3 proc. **specifiškumas**, IgA specifiškumas buvo 99,2 proc, ir bendras IgG + IgA specifiškumas buvo 98,3 proc. Atitinkamos su palyginamuoju B gamintojo EIA rinkiniu gautos vertės buvo 97,5 proc. (IgG), 99,2 proc. (IgA) ir 96,7 proc. (IgG + IgA). Palyginamojo A gamintojo EIA rinkinio IgG specifiškumas šioje populiacijoje buvo 91,7 proc. (IgA EIA negamina).

Specifiškumas (ligoninėje gydomų vaikų, nesergančių skrandžio–žarnyno ligomis, populiacija, 3-asis tyrimas)

Sekančiame klinikiniame tyrime, kuriame su *Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II buvo tirti Vokietijos vaikų populiacijos serumai (n = 200, mažas paplitimas) teigiami rezultatai buvo gauti 7,0 proc. atvejų (IgG), arba 3,0 proc. atvejų (IgA) (bendra teigiamų IgG + IgA atvejų dalis – 8,0 proc.). Iš teigiamų mėginių, teigiamais buvo pripažinti 87.5 proc. (14/16) naudojant B gamintojo gaminamą EIA rinkinį. Atmetus mėginius, kurių rezultatas yra visada teigiamas, galima daryti prielaidą, kad **santykinis specifiškumas** (IgG, IgA), palyginti su gamintojo B EIA rinkiniu, yra ≥ 98 proc.

Tikslumas ir atkartojamumas

Buvo ištirti keturi mėginiai, kuriuose buvo skirtingas specifinių *H. pylori* IgA antikūnų kiekis, siekiant nustatyti nukrypimo koeficientą (CV), testą atliekant tuo pačiu metodu ir skirtingais metodais, bei gauti tokie rezultatai:

Enzygnost® Anti-*H. pylori* II/IgA

Mėginys	Vidutinė absorbcijos vertė•••	Tiriant tuo pačiu metodu, CV••• (%)	Tiriant skirtingu metodu, CV••• (%)
FP 1	0,084	5,7	2,7
FP 2	0,432	3,0	2,9
FP 3	0,842	4,0	4,5
FP 4	0,718	2,6	6,1

••• Vidutinės vertės ir CV atsižvelgiant į nukrypimų analizę, remiantis 8 kartus pakartotais 5 testų rezultatais (n = 40)

Pastaba: Tai yra tirtų mėginių grupių rezultatai.

BEP, BEP 2000 Advance ir *Enzygnost* yra *Siemens Healthcare Diagnostics* registruoti prekės ženklai.

Tetronic yra BASF prekės ženklas.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburgas / Vokietija
www.siemens.com/diagnostics

CE

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 20	nuo +2 iki +8° C	per naktį**
<i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>H. pylori</i> II/IgA testo plokštelė	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	8 savaitės
Buferinis tirpalas POD mėginiui	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	8 savaitės
Antikūnų žmogaus IgA/POD konjugatas (<i>H. pylori</i>)	Atidarius praskiestas 1 + 50	nuo +2 iki +8° C nuo +15 iki +25° C nuo +2 iki +8° C	stabilus 12 mėnesių 1 diena 8 savaitės
Konjugato buferinis tirpalas, mikrobiologinis:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	8 savaitės
Antikūnų <i>H. pylori</i> referentinis P/P ir antikūnų- <i>H. pylori</i> referentinis N/N	Atidarius praskiestas 1 + 20	nuo +2 iki +8° C nuo +2 iki +8° C ≤ -20 °C (mėginiuose)	stabilus 12 mėnesių per naktį 8 savaitės
Mėlynas dažantysis skystis <i>Enzygnost</i> [®] sistemoms	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Chromogenas TMB	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Buferinis tirpalas / substratas TMB	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Chromogeno darbinis tirpalas	praskiestas 1 + 10 uždarytame inde apsaugotas nuo šviesos	nuo +2 iki +8° C nuo +15 iki +25° C	5 dienos 8 valandos
Plovimo tirpalas POD	Atidarius praskiestas 1 + 19	nuo +2 iki +8° C nuo +2 iki +8° C nuo +18 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 1 savaitė 1 diena
Reakcijos sustabdymo tirpalas POD	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

** uždareame skiedimui skirtame inde, kuriam būdinga žema baltymų surišanti geba.

2 lentelė: Procedūra

Enzygnost[®] Anti-*Helicobacter pylori* II/IgA

Reagentų paruošimas

Antikūnų *H. pylori* referentinio N/N mėginio,
Antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginys ir mėginių praskiedimas 1 + 20
(dažytu) buferiniu tirpalu POD mėginiams

2 x 100 µL antikūnų-*H. pylori* referentinio N/N mėginio (1 + 20)
1 x 100 µL antikūnų-*H. pylori* referentinio P/P mėginio (1 + 20)
100 µl kiekvieno praskiesto mėginio
1 x 100 µL antikūnų-*H. pylori* referentinio P/P mėginio (1 + 20)

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min. (+37 ± 1° C)

Plaukite 4 kartus

BEP[®] 2000

Visiškai automatizuotas
testo atlikimas

100 µl konjugato
darbinio tirpalo

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min. (+37 ± 1° C)

Plaukite 4 kartus

100 µL chromogeno darbinio tirpalo

BEP[®] III:

Visiškai automatizuotas
testo atlikimas

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min.

(nuo +18 iki +25° C)

(apsaugoti nuo šviesos)

100 µl reakcijos sustabdymo tirpalo

(vėliausiai po 60 min.)

Matavimas:

450 nm palyginant su 650 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. Warren J. R., Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 321: 1273-75.
2. Goodwin C. S., Armstrong J. A., Chilvers T., et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405.
3. Rathbone B. J., Wyatt J. I., Heatley R. V. *Campylobacter pyloridis* - a new factor in peptic ulcer disease? *Gut* 1986; 27: 635-41.
4. Blaser M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990; 161: 626-33.
5. Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-31.
6. Marshall B. J., Warren J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 323: 1311-5.
7. Graham D. Y., Klein P. D., Evans D. J., et al. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1987; 329: 1174-7.
8. Rowland M., Lambert I., Gormally S., et al. Carbon 13-labeled urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr* 1997; 131: 815-20.
9. Jones D. M., Eldridge J., Fox A. J., et al. Antibody to the gastric campylobacter-like organism („*Campylobacter pyloridis*“) - clinical correlations and distribution in the normal population. *J Med Microbiol* 1986; 22: 57-62.
10. Kaldor J., Tee W., McCarthy P., et al. Immune response to *Campylobacter pyloridis* in patients with peptic ulceration. *Lancet* 1985; 325: 921.
11. Cutler A. F., Havstad S., Ma C. K., et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995; 109: 136-41.
12. Xiang Z., Censini S., Bayeli P. F., et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-8.
13. Kosunen T. U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992; 339: 893-5.
14. Cullen D. J., Cullen K. J., Collins B. J., et al. Serological assessment of *Helicobacter pylori* eradication. *Lancet* 1992; 340: 1161-2.
15. Dopatka H. D., Giesendorf B. Single point quantification of antibody by ELISA without need of a reference curve. *J Clin Lab Anal* 1992; 6: 417-22.
16. Faulde M., Putzker M., Mertes T., Sobe D. Evaluation of an immunofluorescence assay for specific detection of immunoglobulin G antibodies directed against *Helicobacter pylori*, and antigenic cross-reactivity between *H. pylori* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 323-7.
17. Jaskowski T. D., Martins T. B., Hill H. R., Litwin C. M. Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2999-3000.
18. Taylor D. N., Blaser M. J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 42-59.

SIEMENS

Enzygnost[®] Anti-Helicobacter pylori II/IgG

Imunofermentinis metodas kokybiniam aptikimui ir kiekybiniam specifinių *Helicobacter pylori* IgG antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume ir plazmoje.

Anglų kalba: nuo 2 iki 12 puslapio

Procedūros santrauka pateikiama 12 psl.

Literatūros sąrašas pateikiamas 68 psl.

Enzygnost® Anti-Helicobacter pylori II/IgG

Atkreipkite dėmesį į nuspalvintas teksto dalis – čia pateikiama atnaujinta informacija, palyginti su 2008 m. balandžio mėn. leidimu.

Naudojimo paskirtis

Imunofermentinis metodas kokybiniam aptikimui ir kiekybiniam specifinių *Helicobacter pylori* IgG antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume ir plazmoje.

Imunofermentinį testą galima atlikti naudojant ELISA analizatorius, BEP® III sistemą, BEP® 2000 sistemą arba BEP 2000 Advance® sistemą. Taip pat testą galima atlikti nenaudojant automatizuotų prietaisų.

Santrauka ir paaiškinimai

Warren ir Marshall 1983 m. pirmą kartą pavyko iš paciento skrandžio paimtos biopsinės medžiagos išauginti įviją gram-neigiamą bakteriją.¹ Pradžioje sukėlėjas buvo pavadintas *Campylobacter pyloridis*, o vėliau – *Campylobacter pylori*. 1989 m. bakterijos taksonominė padėtis buvo patikslinta ir ji pavadinta *Helicobacter pylori*.²

Keliuose iki dabar atliktuose tyrimuose buvo nustatyta glaudi koreliacija tarp gastrito bei peptinės opos ir skrandžio gleivinės infekcijos, sukeltos *H. pylori*.^{3, 4} *H. pylori* infekcija turi būti laikoma skrandžio karcinomos išsivystymo rizikos veiksniu.⁵ Kultūroje sukėlėją aptikti yra nelengva, tačiau *H. pylori* galima aptikti skrandžio biopsijos mėginiuose panaudojant specialius dažymo metodus.⁶ *H. pylori* būdintas didelis ureazės aktyvumas. Ši savybė suteikia galimybių pritaikyti diagnostinę procedūrą, per kurią pacientas, nurijęs izotopu pažymėto šlapalo, išskvepia atitinkamai pažymėto CO₂, kurį galima aptikti masės spektrometrijos metodu.^{7, 8}

Pacientams, užsikrėtusiems *H. pylori* infekcijomis, randama su *H. pylori* reaguojančių antikūnų,^{9, 10} kurių kiekį serume galima nustatyti imunofermentiniu metodu. Kadangi liga yra lėtinė, sukėlėjui specifinių IgG arba IgA antikūnų nustatymas turi didelę klinikinę vertę. Remiantis šiuo metu turimomis žiniomis, sukėlėjui specifinių IgM antikūnų nustatymas nėra toks svarbus.¹¹

Nustatyta išskirtinė glaudi koreliacija tarp dvylikapirštės žarnos opų ir vadinamojo 1 tipo *H. pylori* padermių, kurios išskiria patogeniškumo veiksnių – „vakuolizuojantį toksiną“ (VacA) ir „su citotoksinu susijusį glikoproteiną A“ (CagA).¹²

Neseniai paskelbtose mokslinėse publikacijose nurodoma, kad gydymo eigą galima sekti ELISA analizatoriumi atliekant titrų testus.^{13, 14}

Metodo principas

Tiriamajame mėginyje esantys specifiniai *H. pylori* IgG antikūnai susiriša su testo plokštelės reakcijos šulinėliuose esančiais antigenais. Antikūnų žmogaus IgG/POD konjugatas susijungia su šiais specifiniais antikūnais. Konjugate esantis fermentas pakeičia chromogenino darbinio tirpalo spalvą ir jis pamėlynuoja. Reakcija sustabdoma pridėjus reakciją stabdančio POD tirpalo, kuris spalvą pakeičia į geltoną.

Susidariusios geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *H. pylori* IgG antikūnų kiekiui. Perskaičiavimas į Enzygnost® vienetus (U/ml) atliekamas taikant skaičiavimo α-metodą.¹⁵

Reagentai Simboliai

[MTP]	Pateikiamos medžiagos <i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>Helicobacter pylori</i> II/IgG 1 x 96
[REFER P/P]	<i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>H. pylori</i> II/IgG testo plokštelė 1 vnt.
[REFER N/N]	Anti- <i>H. pylori</i> referentinis P/P 0,3 ml
[DILUENT]	Anti- <i>H. pylori</i> referentinis N/N 0,3 ml
[CONJUGATE ANTI-G]	Buferinis tirpalas mėginiui POD 2 x 50 ml
[MICROBIOL A]	Antikūnų žmogaus IgG/POD konjugatas (<i>H. pylori</i>) 1,0 ml
	Buferinis tirpalas konjugatui, mikrobiologinis 2 x 12,5 ml
	Polietileno maišelis, 1 vnt.
	Verčių brūkšninių kodų lentelė, 1 vnt.
	Naudojimo instrukcijos, 1 vnt.

Testo plokštelė, konjugatas, antikūnų *H.pylori* referentinis P/P tirpalas ir antikūnų *H.pylori* referentinis N/N tirpalas, ant pakuotės pažymėti vienodu 6 skaičių partijos numeriu ir atitinkamai įrašyti į pridedamas verčių brūkšninių kodų lenteles, turi būti naudojami kartu. Atliekant kokybinius ir kiekybinius testus visos medžiagos turi būti naudojamos tik iš vieno rinkinio.

Papildomos reikalingos bet netiekiamos medžiagos

Papildomi reagentai *Enzygnost*[®]/TMB ([REF] OUVP).

Galima naudoti tik tų gamybos partijų reagentus Chromogen TMB ir buferis / substratas TMB, kurios yra nurodytos Papildomų reagentų rinkinyje OUVP. Partijų numeriai yra šešiaženkliai partijų numeriai, nurodyti ant pakuotės.

Sudėtis

***Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II/IgG testo plokštelė:** mikrotitravimo plokštelė, padengta inaktyvuotais *H. pylori* antigenais (detergentų pagalba gautas ekstraktas iš CagA ir VacA išskiriančios padermės).

Antikūnų žmogaus IgG/POD konjugatas (*H. pylori*): Ožkos antikūnų žmogaus IgA F(ab)' frakcija, konjuuguota su peroksidaze, Tris/HCl buferiniame tirpale (0,05 mol/l). Konjugatas yra žalios spalvos.

Dažai: tartrazinas (440 mg/l) ir ryškūs mėlyni (60 mg/l)

Konservantas: fenolis (1 g/l).

Antikūnų *H. pylori* referentinis P/P: Žmogaus serumas, kuriame yra IgG ir IgA klasių antikūnų *H. pylori* antigenams.

Nominalios vertės, kurių reikia vertinimui, bei jų viršutinė ir apatinė riba nurodytos verčių brūkšninių kodų lentelėje.

Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Antikūnų *H. pylori* referentinis N/N: Žmogaus serumas, kuriame nėra antikūnų *H. pylori* antigenams.

Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Konjugato buferinis tirpalas, mikrobiologinis: EDTA (37 mg/l) fosfatinio buferio tirpale (0,01 mol/l) su *Tetronic*[®] (2 %) ir BSA (1 %), pH vertė: 7,0 – 7,4. Skirtas naudoti ruošiant konjugato darbinį praskiestą tirpalą. Konservantai: gentamicinas (100 mg/l), 5-chloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onas (6 mg/l), 2-metil-4-izotiazolin-3-onas (2 mg/l).

Buferinis tirpalas POD mėginiui: Šis Tris/HCl tirpalas (0,3 mol/l) turi būti naudojamas praskiesti tiriamuosius mėginius ir referentinius mėginius. Konservantai: amfotericinas (5 mg/l) ir gentamicinas (100 mg/l).

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.
2. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos.
3. Kiekvienas donoras ar donorinė medžiaga buvo patikrinta dėl 1 ir 2 tipo žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV), hepatito B viruso (HBV) ir hepatito C viruso (HCV), tyrimams atlikti naudojant testus, atitinkančius ES direktyvą dėl *in vitro* diagnostikos, ar Maisto ir vaistų agentūros (FDA) patvirtintus testus; testų rezultatai buvo neigiami. Kadangi nei vienas žinomas testas negali suteikti absoliučios garantijos, kad infekcijos sukėlėjų nėra, su visais iš žmogaus audinių pagamintais produktais reikia dirbti taikant atitinkamas atsargumo priemones.
4. Patariama atliekant visas testo procedūras mūvėti apsaugines pirštines. Prašome laikytis gamintojo pateiktų rekomendacijų dėl pirštinių ir naudojamų medžiagų suderinamumo,
5. Tvarkant atliekas rekomenduojama kietas užterštas medžiagas autoklavuoti mažiausiai vieną valandą +121° C temperatūroje. Visi surinkti skysčiai turi būti supilami į dvi talpyklas, sujungtas nuosekliai. Kiekvienoje iš jų turi būti dezinfekcinės medžiagos, tinkančios pašalinti žmonių patogenų kenksmingumą. Būtina naudoti gamintojo nurodytas koncentracijas ir išlaukti nurodytą poveikio laiką.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdant atlikti testą visus reagentus ir tiriamuosius mėginius atsineškite į patalpą, kurios temperatūra yra nuo +18 iki +25° C. Nuo testo plokštelių folijos lapelių šiame etape nenuimkite. Prieš pradėdami testo procedūras nuo laikiklio nuimkite nereikalingas juosteles ir padėkite į užklįjiojamą polietileno maišelį, kad galėtumėte panaudoti vėliau (žr. 1 lentelę). Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Praskieskite antikūnų žmogaus IgG/POD konjugatą (*H. pylori*) 1 + 50 su konjugato buferiniu tirpalu mikrobiologijai, pvz., vienai testo plokštei 250 μl konjugato supilkite į buteliuką su 12,5 ml konjugato buferinio tirpalo mikrobiologijai. Švelniai supurtykite, kad susimaišytų.

Skiedžiant mėginius 50 ml buferinio tirpalo POD mėginiams galima nuspalvinti mėlynai violetine spalva pridėdant 2,5 ml mėlyno spalvą suteikiančio tirpalo *Enzygost*[®] testams (iš Papildomų reagentų *Enzygost*[®]/ TMB rinkinio). Švelniai supurtykite, kad susimaišytų. Šio mėlynai-violetinė spalva nudažyto buferinio tirpalo POD mėginiams nenaudokite lašinti į mikroplokštelės šulinėlius.

Nedidelis kiekis netirpių nuosėdų buferiniame tirpale POD mėginiams problemų nesukelia.

Kiekvienai plokštei 20 ml plovimo tirpalo POD (papildomi reagentai *Enzygost*[®]/TMB) praskieskite 4 distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu iki 400 ml.

Kiekvienai plokštei 1 ml Chromogen TMB tirpalo praskieskite 10 ml buferinio tirpalo / substratu TMB (chromogeno darbinis tirpalas), esančiu Papildomų reagentų *Enzygost*[®]/TMB rinkinyje; tam panaudokite pridėdamą plastikinį buteliuką. Laikykite saugodami nuo šviesos. Panaudoję buteliuką kruopščiai praskalaukite distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu.

Dėl techninių priežasčių (perpildymas) Chromogen TMB buteliuko turinio neleidžiama supilti į buferio / substrato TMB buteliuką.

Laikymas ir stabilumas

Visus neatidarytus testo rinkinio komponentus laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje, galima naudoti iki ant etiketės nurodyto tinkamumo laiko pabaigos.

Išsamūs duomenys apie atidarytų ar praskiestų reagentų stabilumą ir laikymą pateikti priede, 1 lentelėje.

Reikalinga įranga

BEP[®] III: skirta automatiškai atlikti testą ir jį įvertinti po to, kai mėginiai išpilstyti.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Stūmoklinio tipo, fiksuoto ar kintamo tūrio, vienkanalės ar daugiakanalės reguliuojamo tūrio pipetės.

Jeigu testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų, reikia tokios papildomos įrangos:

Inkubatorius: uždaroma termostatinė vandens vonia ($+37 \pm 1^{\circ} \text{C}$) ar panašus inkubavimo metodas.

Plovimo prietaisas: mikrotitravimo plokštelių plovimo prietaisas.

Fotometras: mikrotitravimo plokštelėms tinkantis fotometras, matuojantis 450 nm ilgio bangomis, referentinis bangos ilgis 650 nm (nuo 615 nm iki 690 nm atitinkamai).

Kiekybiniam testo įvertinimui: kišeninis skaičiuotuvas su eksponentine ir logaritmine funkcija.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tinkama tiriamoji medžiaga yra iš tiriamųjų asmenų paimti mėginiai (žmogaus serumas ar EDTA /heparinu / citratu apdorota plazma), gauti įprastais laboratoriniais metodais. Mėginius galima laikyti ne ilgiau kaip 3 dienas +2 – +8° C temperatūroje. Jeigu mėginius reikia laikyti ilgiau, jie turi būti užšaldomi.

Procedūra

Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų

1. Mėginių praskiedimas: Praskieskite visus mėginius, antikūnų *H. pylori* referentinį P/P ir antikūnų *H. pylori* referentinį N/N mėginius santykiu 1+20 panaudodami mėlynai-violetinės spalvos buferinį tirpalą POD mėginimas, pvz., 20 mėginio pipete sulašindami į mėgintuvėlį skiedimui ir pridėdami 400 μl buferinio tirpalo POD mėginims. Švelniai supurtykite, kad turinys gerai susimaišytų. Praskiesti mėginiai gali būti laikomi sandariai uždaryti +2 to +8° C talpyklose, pasižyminčiose žema baltymus surišančia geba.
2. Testo atlikimo schema: Reikalingas mikrotitravimo plokštelių šulinėlių skaičius paskaičiuojamas atsižvelgiant į mėginių skaičių, pridėdant po du šulinėlius kiekvienam antikūnų *H. pylori* referentiniam P/P ir antikūnų *H. pylori* referentiniam N/N mėginiui.
3. Buferio išpilstymas: į kiekvieną naudojamą testo plokštelės šulinėlį įlašinkite po 200 μl nedažyto buferinio tirpalo POD mėginims.
4. Mėginių išpilstymas: Į Enzygnost® Anti-*H. pylori* II/IgA testo plokštelės pirmosios juostelės pirmuosius du šulinėlius sulašinkite po 20 μl antikūnų *H. pylori* referentinio N/N mėginio, praskiesto, kaip nurodyta 1 etape, o sekantį šulinėlį – antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginio. Tada į kiekvieną sekantį juostelių šulinėlį sulašinkite po 20 μl praskiestų mėginių. Į paskutinį testo juostelės ar mikrotitravimo plokštelės šulinėlį įlašinkite 20 μl antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginio.

Svarbu: Neleidžiama teigiamos kontrolės tirpalo sulašinti pradžioje iš karto į abu tiriamųjų mėginių serijos pradžioje ir pabaigoje esančius šulinėlius, o vėliau „mėginius sulašinti tarp jų“.

Išpilstę kiekvieno šulinėlio turinį kruopščiai sumaišykite, mažiausiai du kartus turinį įtraukiant iš išstumiant iš pipetės. Tai atliekant kiekvienam mėginiui reikia naudoti naują pipetės antgalį. Į testo plokštelę mėginius reikia sulašinti per 15 minučių. Naudojant 8 kanalų pipetę praskiestų mėginių lašinimo į testo plokštelę procedūra atliekama paprasčiau ir greičiau. Sulašinę mėginius, užklijuokite testo plokštelę folija ir nedelsdami (ne vėliau kaip per 15 minučių) įdėkite į inkubatorių.

5. Inkubavimas: Inkubuokite +37 ± 1° C temperatūroje 30 ± 2 minučių, o tada nedelsdami pradėkite plovimo etapą.

6. Plovimas: Nuimkite foliją ir iš visų šulinėlių nusiurbkite skystį. Į kiekvieną šulinėlį sulašinkite maždaug 0,3 ml praskiesto plovimo tirpalo POD, nusiurbkite skystį iš visų plokštelės šulinėlių ir pakartokite plovimo procedūrą dar 3 kartus. Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

7. Konjugato išpilstymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 antikūnų žmogaus Ig G / POD konjugato (*H. pylori*). Uždenkite plokštelę nauju folijos lapeliu ir nedelsdami įdėkite į inkubatorių.

8. Inkubavimas: Inkubuokite +37 ± 1° C temperatūroje 30 ± 2 minučių, o tada nedelsdami pradėkite plovimo etapą.

9. Plovimas: Plaukite, kaip aprašyta 6-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite po 100 μ l chromogeno darbinio tirpalo ir uždenkite plokštelę nauju folijos lapeliu.
10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami inkubuokite +18 – +25° C temperatūroje, **saugodami nuo šviesos**.
11. Reakcijos sustabdymas: Nuimkite foliją. Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 μ l reakcijos stabdančio POD tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
12. Matavimas: Per valandą įvertinkite reakcijos testo plokštelėje rezultatus, matavimus atlikdami 450 nm ilgio bangomis. Rekomenduojamas referentinis bangos ilgis yra 650 nm, arba, kai tinka nuo 615 iki 690 nm.

Procedūra naudojant BEP® III sistemą

Naudojant BEP® III, testo plokštelės reikia paruošti į jas išpilstant tiriamuosius mėginius (1– 4 etapai, aprašyti skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“).

Iš karto po to neuždengtos testo plokštelės, t. y., neuždengtos folija, dedamos į BEP® III.

Visus kitus procedūros etapus automatiškai atlieka prietaisas (žr. BEP® III prietaiso naudojimo instrukciją). BEP® III prietaiso programinėje įrangoje nustatyti inkubavimo laikai dėl techninių priežasčių (sistemos greičio) gali skirtis nuo aprašytųjų skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“, tačiau BEP® III sistema yra patikrinta ir tinka dirbti su Enzygnost® produktais.

Procedūra naudojant BEP® 2000 sistemą

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. BEP® 2000 naudojimo vadovą).

BEP® 2000 prietaiso programinėje įrangoje nustatyti inkubavimo laikai ir mėginių maišymo režimas gali skirtis nuo aprašytųjų skyrelyje „Procedūra, kai testas atliekamas nenaudojant automatizuotų prietaisų“, tačiau BEP® 2000 sistema yra patikrinta ir tinka dirbti su Enzygnost® produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Patikrinimo kriterijai

Kad testą būtų galima vertinti, jis turi atitikti tokius kriterijus:

1. Antikūnų *H. pylori* referentinis N/N: $A_{450nm} \leq 0,150$ (kiekvienos atskiros vertės);
2. Antikūnų *H. pylori* referentinis P/P:

Kiekviena atskira vertė turi patekti į intervalą tarp viršutinės ir apatinės ribos, nurodytos atitinkamoje verčių brūkšnių kodų lentelėje:

apatinė riba $\leq A_{\text{antikūnų } H. pylori \text{ referentinis P/P}} \leq$ viršutinė riba.

Be to, kiekviena atskira vertė (antikūnų *H. pylori* referentio P/P mėginių serijos arba testo plokštelės pradžioje ir pabaigoje) tarpusavyje negali skirti daugiau kaip ± 20 proc. nuo paskaičiuotos vidutinės šių verčių vertės.

Jeigu šios sąlygos netenkinamos, testo vertinti negalima. Matavimus reikia pakartoti ištyrus klaidos priežastis.

Rezultatų apskaičiavimas

Naudojant BEP® 2000 ir BEP® III rezultatai apskaičiuojami automatiškai.. Prašome vadovautis atitinkamu naudojimo vadovu. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Matavimų koregavimas

Norint pasiekti geriausią rezultatų atkartojamumą, matavimus **reikia koreguoti**, tai taikytina **kiekybiniam įvertinimui**, kuris atliekamas α -metodu, ir **kokybiniam** testo įvertinimui.

Pirmiausia apskaičiuokite vidutinę referentinio P/P absorbcijos (A) vertę.

Tada apskaičiuojamas korekcijos koeficientas – nominaliąją vertę, nurodytą verčių brūkšnių kodų lentelėje, padalinant iš apskaičiuotos vidutinės referentinio P/P absorbcijos vertės:

A nominalioji vertė

Korekcijos koeficientas• = _____

Vidutinė A vertė_{referentinis P/P}

- Mėginių absorbcijos vertė dauginama iš šio koeficiento.
- Pavyzdys pateikiamas skyrelyje „Kiekybinis įvertinimas“.

Kokybinis įvertinimas

Kokybiniam vertinimui taikomi tokie kriterijai:

Antikūnai *Helicobacter pylori*/IgG **neigiamas** $A_{\text{mėginio}} < 0,250$ (ribinė vertė)

Antikūnai *Helicobacter pylori*/IgG **teigiamas** $A_{\text{mėginio}} \geq 0,250$.

Jeigu rezultatas yra labai artimas ribinei vertei, prašome vadovautis nurodymais, pateiktas skyrelio „Specialios testo charakteristikos“ paantraštėje „Matavimo intervalas“.

Kiekybinis įvertinimas taikant α -metodą

Mėginiai, kuriuose IgG antikūnų aktyvumas yra didesnis už ribinę vertę, gali būti įvertinti kiekybiškai taikant α -metodą.

Skaičiavimams nenaudokite:

– (A) koreguotų rezultatų $<$ už ribinę vertę;

– (A) nekoreguotų rezultatų $> 2,5$.

Mėginiai, kurių absorbcijos reikšmė (nekoreguota) yra didesnė kaip 2,5 turi būti tiriami praskiesti 1+2309, kad vertinimas būtų teisingas.

Perskaičiavimas į U/ml atliekamas naudojant tokią formulę:

$$\text{Log}_{10} \text{ U/mL} = \alpha \times A^{\beta}$$

Kiekvienos partijos α ir β konstantreikšmės pateikiamos pridedamoje verčių brūkšninių kodų lentelėje.

Pavyzdys:

Absorbcijos vertės:	Kišeninis skaičiuotuvas:
Antikūnų <i>H. pylori</i> referentinis P/P	
bandinių serijos pradžioje 1,374 A	
bandinių serijos pabaigoje 1,188 A	
Vidutinė vertė 1,281 A	
Nominalioji vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 1,024 A	
Korekcijos koeficientas (žr. lygtį) 0,799	
Mėginio testo rezultatas 1,778 A	
Mėginio testo rezultatas koreguotas 1,421 A	Įvedamas skaičius 1,421 Nuspauskite klavišą X^y
β vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 0,4016	Įvedamas skaičius 0,4016 Nuspauskite klavišą = Nuspauskite klavišą x
α vertė iš verčių brūkšninių kodų lentelės 1,6841	Įvedamas skaičius 1,6841
Log ₁₀ U/ml 1,9393	Nuspauskite klavišą = Nuspauskite klavišą INV ir log arba 10^x
Rezultatas 87,0 U/ml	

Skaičiavimas pritaikytas mėginiui, praskiestam 1 + 230. Jeigu mėginys praskiestas 1 + 2309, rezultatą (ne prietaiso parodymą) reikia padauginti iš 10.

Rezultatai pateikiami vienetais (U) paciento plazmos ar serumo mėginio ml.

Vertes galima atsekti *Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH* vidaus standarte.

Rezultatų vertinimas

Enzygnost[®] Anti-*H. pylori* II/IgG galima aptikti tik IgG klasės antikūnus, panaudojant γ -specifinį konjugatą.

Teigiamas testo rezultatas yra įrodymas, kad yra specifinių *H. pylori* antikūnų, tačiau tai neleidžia atskirti aktyvios infekcijos ir (besimptomės) *H. pylori* kolonizacijos bei galutinai nepatvirtina esančios skrandžio ar žarnyno ligos.

Kadangi *H. pylori* ir *Campylobacter* antigenai yra susiję, negalima atmesti klaidingai teigiamos reakcijos, kurią sukelia kryžmiškai reaguojantys antikūnai. Tačiau keletas autorių nurodo, kad galimų kryžminių reakcijų klinikinė svarba yra nedidelė.¹⁶

Neigiamas testo rezultatas rodo, kad IgG antikūnų *H. pylori* mėginyje nėra, arba jų koncentracija yra tokia maža, kokios atliekant testą nustatyti neįmanoma. Jeigu atlikus abu testus (IgG ir IgA antikūnams aptikti) testo rezultatas yra neigiamas, tai reiškia, kad specifinių *H. pylori* antikūnų aptikti neįmanoma.

Reikšmingai pacientų daliai (maždaug 2 – 7 proc.), IgG antikūnų testo rezultatas gali būti neigiamas, nepaisant akivaizdžios infekcijos, nors tuo pat metu specifinių *H. pylori* IgA klasės antikūnų gali būti randama.^{13, 17}

Todėl turėtų būti laikomasi pagrindinio principo – lygiagrečiai reikia atlikti abiejų klasių antikūnų testus. Be to IgG arba IgA antikūnai, specifiniai *H. pylori*, pasižymi skirtinga kinetika paskyrus gydymą antibiotikais, taigi, juos reikia lygiagrečiai tirti stebint gydymą.

Procedūros ribojimai

1. Krešėjimą slopinantys preparatai, pavyzdžiui, EDTA ar heparinas testo rezultatams įtakos neturi.
2. Lipeminiai ar hemoliziniai mėginiai, bei mėginiai, kuriuose yra reumatoidinio veiksnio testo atlikti netrukdo.
3. Testas buvo atliktas su mėginiais, kuriuose buvo IgM antikūnų Epštein–Baro virusui, IgM antikūnų HSV ar IgM antikūnų raudonukės virusui. Tiriant šiuos mėginius jokios įtakos testo rezultatams nebuvo nustatyta.
4. Tiriant karščiu apdorotus mėginius (30 minučių, +56° C temperatūroje) sąveikos nepastebėta.
5. Negalima naudoti ne visiškai sukrešėjusio serumo ar mikroorganizmais užterštų mėginių. Bet kokios mėginiuose esančios dalelės (pvz., fibrino krešuliai, eritrocitai) prieš atliekant testą iš mėginio turi būti pašalintos.
6. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
7. Būtina vengti buferinio tirpalo / substrato YMB, darbinio chromogeno tirpalo ir reakcijos sustabdymo POD tirpalo sąveikos su sunkiųjų metalų jonais ar oksiduojančiomis medžiagomis (nenaudokite pipečių, kuriose yra metalinių detalių, tiesiogiai susiliečiančių su skysčiu). Substrato reakcijos etapų negalima atlikti ten, kur greta yra dezinfekcinių medžiagų, kurių sudėtyje yra hipochlorito. Jeigu darbinis chromogeno tirpalas savaime pamėlynavo prieš jį sulašinant į plokštelę, tai rodo, kad tirpalas yra užterštas; tokiais atvejais švariame inde paruoškite naują tirpalą. Reikia vengti pirmiau išvardytų tirpalų patekimo ant odos.
8. Jeigu mėginiai reaguoja labai intensyviai, stabdant reakciją dažai gali precipituoti. Fotometriniams įvertinimui tai netrukdo.
9. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
10. Nedidelis kiekis netirpių nuosėdų buferiniame tirpale POD mėginiams problemų nesukelia.
11. *Enzygnost*[®] Anti-*Helicobacter pylori* II/IgA turi būti naudojamas tik pacientams, turintiems medicininio pobūdžio nusiskundimų arba patiriantiems atitinkamų skrandžio – žarnyno ligos simptomų, tačiau ne simptomų nepatiriantiems pacientams.
12. *Siemens* patikrina šiuos reagentus su įvairiais analizatoriais, kad produktas būtų kiek įmanoma veiksmingesnis ir atitiktų jam taikytinas specifikacijas. *Siemens* nepritaria vartotojų sugalvotiems

pakeitimams, nes jie gali turėti įtakos sistemos charakteristikoms ir testo rezultatams. Už šių nurodymų pakeitimų įteisinimą ar reagentų arba analizatorių, neįrašytų į *Siemens* aprašus ar neišvardytų šiuose nurodymuose, naudojimą yra atsakingas naudotojas.

13. Šio testo rezultatus visada reikia vertinti atsižvelgiant į paciento medicininę istoriją, klinikinius požymius ir kitus duomenis.

Laukiamos vertės

Asmenų, su teigiamais serologiniais *H. pylori* požymiais paplitimas yra labai susijęs su amžiumi. Kaip taisyklė, bakterijų paplitimas tarp vaikų, gyvenančių išsivysčiusiose valstybėse, kuriose taikomi aukšti higienos reikalavimai, yra mažesnis kaip 10 proc., todėl teigiami *H. pylori* testo rezultatai su didele tikimybe leidžia įtarti užsikrėtimą sukėlėju. Asmenų, kurių organizme randama antikūnų, skaičius didėja su amžiumi; tarp vyresnių kaip 30 metų amžiaus pacientų užsikrėtusiųjų bakterijomis dalis (%) apytiksliai koreliuoja su amžiumi metais. Bakterijų paplitimo lygis normalioje besivystančių šalių populiacijoje yra gerokai didesnis nei Centrinėje Europoje ar Šiaurės Amerikoje.¹⁸

Specialios testo charakteristikos

Matavimo intervalas

Ribinė testo vertė atitinka 10 U/ml reikšmę, taigi, bet koks rezultatai ≥ 10 U/ml turi būti laikomas teigiamu. Dėl antigenų panašumo su kitomis gram-neigiamomis bakterijomis, kartais galima stebėti nespecifinių kryžminių reakcijų. Dėl šios priežasties ir dėl riboto mėginių, kurių tyrimo rezultatas yra artimas ribinei vertei, rezultatų atkartojamumo, rezultato nuo 10 iki 15 U/ml negalima laikyti patikimai teigiamu. Mėginiai, kuriuos ištyrus kelis kartus gaunami nevienareikšmiai rezultatai, turi būti ištirti ir įvertinti kaip teigiami ar neigiami taikant papildomus metodus, pavyzdžiui, iškvepiamo oro ¹³C testą.

Jautrumas ir specifiškumas (suaugusiųjų populiacija, 1-asis tyrimas)

Šiame tyrime buvo ištirti 461 serumo mėginys, paimtas ir pacientų, kuriems liga buvo diagnozuota remiantis būdingais klinikiniais požymiais. Paciento būklė buvo įvertinama remiantis turimais endoskopijos duomenimis (sukėlėjo kultūra, histologinis įvertinimas, įskaitant dažytų bakterijų tyrimą) ir serologiniais duomenimis (testas imunofermentiniu metodu, *Western Blot* metodu). Remiantis tokiu būdu atliktu įvertinimu 80 pacientų buvo priskirta *H. pylori* neužsikrėtusių grupei ir 381 pacientas buvo priskirtas *H. pylori* užsikrėtusiųjų grupei.

Ištyrus 381 užsikrėtusiųjų pacientų mėginius buvo gauti tokie **jautrumo duomenys**:

Enzygnost® Anti-*H. pylori* II (IgG, IgA) jautrumas

Simptomas	Mėginių skaičius n (%)	IgG-teigiamas n (%)	IgA teigiamas n (%)	IgG ir / arba IgA- teigiamas n (%)
Skrandžio vėžys	87 (100)	78 (89,7)	66 (75,9)	82 (94,3)
MALT limfoma	88 (100)	80 (90,9)	70 (79,6)	81 (92,0)
Dvylikapirštės žarnos opa	109 (100)	105 (96,3)	100 (91,7)	108 (99,1)
Skrandžio opa	45 (100)	44 (97,8)	43 (95,6)	45 (100)
Kontrolinė grupė ••	52 (100)	49 (94,2)	45 (86,5)	50 (96,1)
Iš viso:	381 (100)	356 (93,4)	324 (85,0)	366 (96,1)

•• Kontrolinė pacientų grupė (pvz., sergančių gastritu), kurioje buvo rasta ligos endoskopinių požymių.

Panašūs **bendro jautrumo** rezultatai visose pacientų grupėse buvo gauti 96,8 proc. atvejų tyrimui naudojant komercinį IgG-EIA rinkinį (gamintojas A, tirti tik 377 mėginiai), ir 80,6 proc. atvejų OQOPG11C0502A L (1169)

naudojant kitą IgG-EIA rinkinį (gamintojas B). Bendro IgG + IgA jautrumo rezultatai su B gamintojo rinkiniu buvo 84,0 proc. (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

80 neužsikrėtusių asmenų mėginių **bendras specifiškumas** buvo 98,8 proc. testą atliekant su *Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II/IgG, 73,1 proc. – su gamintojo A rinkiniu (tirti tik 78 mėginiai) ir 100 proc. su gamintojo B rinkiniu. Atitinkamos IgA vertės buvo 100 proc. testą atliekant su *Enzygnost*[®] ir 98,8 proc. su gamintojo B rinkiniu. Bendro IgG + IgA specifiškumo vertė buvo 98,8 proc. testą atliekant su gamintojo B rinkiniu ir su *Enzygnost*[®] (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

Jautrumas ir specifiškumas (vaikų populiacija, 2-asis tyrimas)

Antrajame tyrime buvo ištirti 169 serumo mėginiai, paimti iš vaikų, kurių užsikrėtimas *H. pylori* buvo nustatytas atliekant iškvepiamo oro ¹³C testą. Remiantis tokiu būdu atliktu įvertinimu 120 pacientų buvo priskirta *H. pylori* neužsikrėtusių grupei ir 49 pacientai buvo priskirti *H. pylori* užsikrėtusiųjų grupei.

Ištyrus 49 užsikrėtusiųjų pacientų mėginius buvo gauti tokie *Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II **jautrumo duomenys**: IgG 85,7 proc., IgA 42,9 proc. Palyginami testų rezultatai buvo gauti 87,8 proc. atvejų naudojant A gamintojo komercinį IgG EIA rinkinį ir 79,6 proc. atvejų naudojant kitą IgG EIA rinkinį (gamintojas B). Naudojant gamintojo B rinkinį IgA jautrumas buvo tik 24,5 proc. Bendro IgG + IgA jautrumo vertės buvo 87,8 proc. testą atliekant su *Enzygnost*[®] ir 81,6 proc. su gamintojo B EIA rinkiniu (gamintojas A gamina tik IgA EIA rinkinius).

Atmetus užsikrėtusių asmenų mėginius, su *Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II /IgG ištyrus 120 *H. pylori* neigiamų vaikų serumus buvo apskaičiuotas 98,3 proc. **specifiškumas**, IgA specifiškumas buvo 99,2 proc, ir bendras IgG + IgA specifiškumas buvo 98,3 proc. Atitinkamos su palyginamuoju B gamintojo EIA rinkiniu gautos vertės buvo 97,5 proc. (IgG), 99,2 proc. (IgA) ir 96,7 proc. (IgG + IgA). Palyginamojo A gamintojo EIA rinkinio IgG specifiškumas šioje populiacijoje buvo 91,7 proc. (IgA EIA negamina).

Specifiškumas (ligoninėje gydomų vaikų, nesergančių skrandžio–žarnyno ligomis, populiacija, 3-asis tyrimas)

Sekančiame klinikiniam tyime, kuriame su *Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II buvo tirti Vokietijos vaikų populiacijos serumai (n = 200, mažas paplitimas) teigiami rezultatai buvo gauti 7,0 proc. atvejų (IgG), arba 3,0 proc. atvejų (IgA) (bendra teigiamų IgG + IgA atvejų dalis – 8,0 proc.). Iš teigiamų mėginių, teigiamais buvo pripažinti 87,5 proc. (14/16) naudojant B gamintojo gaminamą EIA rinkinį. Atmetus mėginius, kurių rezultatas yra visada teigiamas, galima daryti prielaidą, kad **santykinis specifiškumas** (IgG, IgA), palyginti su gamintojo B EIA rinkiniu, yra ≥ 98 proc.

Tikslumas ir atkartojamumas

Buvo ištirti keturi mėginiai, kuriuose buvo skirtingas specifinių *H. pylori* IgG antikūnų kiekis, siekiant nustatyti nukrypimo koeficientą (CV), testą atliekant tuo pačiu metodu ir skirtingais metodais, bei gauti tokie rezultatai:

***Enzygnost*[®] Anti-*H. pylori* II/IgG**

Mėginys	Vidutinė absorbcijos vertė...	Tiriant tuo pačiu metodu, CV... (%)	Tiriant skirtingu metodu, CV... (%)
FP 1	0,022	4,5	9,9
FP 2	0,245	9,4	2,9
FP 3	0,597	7,8	3,8
FP 4	0,916	5,1	4,9

... Vidutinės vertės ir CV atsižvelgiant į nukrypimų analizę, remiantis 8 kartus pakartotais 5 testų rezultatais (n = 40)

Pastaba: Tai yra tirtų mėginių grupių rezultatai.

BEP, *BEP 2000 Advance* ir *Enzygnost* yra *Siemens Healthcare Diagnostics* registruoti prekės ženklai.

Tetronic yra BASF prekės ženklas.

Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburgas / Vokietija
www.siemens.com/diagnostics

CE

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 20	nuo +2 iki +8° C	per naktį**
<i>Enzygnost</i> [®] Anti- <i>H. pylori</i> II/IgG testo plokštelė	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	8 savaitės
Buferinis tirpalas POD mėginiui	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	8 savaitės
Antikūnų žmogaus IgG/POD konjugatas (<i>H. pylori</i>)	Atidarius praskiestas 1 + 50	nuo +2 iki +8° C nuo +15 iki +25° C nuo +2 iki +8° C	stabilus 12 mėnesių 1 diena 8 savaitės
Konjugato buferinis tirpalas, mikrobiologinis:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	8 savaitės
Antikūnų <i>H. pylori</i> referentinis P/P ir antikūnų- <i>H. pylori</i> referentinis N/N	Atidarius praskiestas 1 + 20	nuo +2 iki +8° C nuo +2 iki +8° C ≤ -20 °C (mėginiuose)	stabilus 12 mėnesių per naktį 8 savaitės
Mėlynas dažantysis skystis <i>Enzygnost</i> [®] sistemoms	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Chromogenas TMB	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Buferinis tirpalas / substratas TMB	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Chromogeno darbinis tirpalas	praskiestas 1 + 10 uždarytame inde apsaugotas nuo šviesos	nuo +2 iki +8° C nuo +15 iki +25° C	5 dienos 8 valandos
Plovimo tirpalas POD	Atidarius praskiestas 1 + 19	nuo +2 iki +8° C nuo +2 iki +8° C nuo +18 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 1 savaitė 1 diena
Reakcijos sustabdymo tirpalas POD	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

** uždareme skiedimui skirtame inde, kuriam būdinga žema baltymų surišanti geba.

2 lentelė: Procedūra

Enzygnost[®] Anti-*Helicobacter pylori* II/IgG

Reagentų paruošimas

Antikūnų *H. pylori* referentinio N/N mėginio,
Antikūnų *H. pylori* referentinio P/P mėginys ir mėginių praskiedimas 1 + 20
(dažytu) buferiniu tirpalu POD mėginiams

Sulašinama po 200 µl buferinio tirpalo POD mėginiams

2 x 20 µl antikūnų-*H. pylori* referentinio N/N mėginio (1 + 20)
1 x 20 µl antikūnų-*H. pylori* referentinio P/P mėginio (1 + 20)
20 µl kiekvieno praskiesto mėginio
1 x 20 µL antikūnų-*H. pylori* referentinio P/P mėginio (1 + 20)

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min. (+37 ± 1° C)

Plaukite 4 kartus

BEP[®] 2000
Visiškai automatizuotas
testo atlikimas

100 µl konjugato
darbinio tirpalo

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min. (+37 ± 1° C)

Plaukite 4 kartus

100 µL chromogeno darbinio tirpalo

BEP[®] III:
Visiškai automatizuotas
testo atlikimas

Inkubavimas:

30 min. ± 2 min.

(nuo +18 iki +25° C)

(apsaugoti nuo šviesos)

100 µl reakcijos sustabdymo tirpalo

(vėliausiai po 60 min.)

Matavimas:

450 nm palyginant su 650 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. Warren J. R., Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 321: 1273-75.
2. Goodwin C. S., Armstrong J. A., Chilvers T., et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405.
3. Rathbone B. J., Wyatt J. I., Heatley R. V. *Campylobacter pyloridis* - a new factor in peptic ulcer disease? *Gut* 1986; 27: 635-41.
4. Blaser M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. *J Infect Dis* 1990; 161: 626-33.
5. Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-31.
6. Marshall B. J., Warren J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 323: 1311-5.
7. Graham D. Y., Klein P. D., Evans D. J., et al. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C-urea breath test. *Lancet* 1987; 329: 1174-7.
8. Rowland M., Lambert I., Gormally S., et al. Carbon 13-labeled urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *J Pediatr* 1997; 131: 815-20.
9. Jones D. M., Eldridge J., Fox A. J., et al. Antibody to the gastric campylobacter-like organism („*Campylobacter pyloridis*“) - clinical correlations and distribution in the normal population. *J Med Microbiol* 1986; 22: 57-62.
10. Kaldor J., Tee W., McCarthy P., et al. Immune response to *Campylobacter pyloridis* in patients with peptic ulceration. *Lancet* 1985; 325: 921.
11. Cutler A. F., Havstad S., Ma C. K., et al. Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1995; 109: 136-41.
12. Xiang Z., Censini S., Bayeli P. F., et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun* 1995; 63: 94-8.
13. Kosunen T. U., Seppälä K., Sarna S., Sipponen P. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992; 339: 893-5.
14. Cullen D. J., Cullen K. J., Collins B. J., et al. Serological assessment of *Helicobacter pylori* eradication. *Lancet* 1992; 340: 1161-2.
15. Dopatka H. D., Giesendorf B. Single point quantification of antibody by ELISA without need of a reference curve. *J Clin Lab Anal* 1992; 6: 417-22.
16. Faulde M., Putzker M., Mertes T., Sobe D. Evaluation of an immunofluorescence assay for specific detection of immunoglobulin G antibodies directed against *Helicobacter pylori*, and antigenic cross-reactivity between *H. pylori* and *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 323-7.
17. Jaskowski T. D., Martins T. B., Hill H. R., Litwin C. M. Immunoglobulin A antibodies to *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2999-3000.
18. Taylor D. N., Blaser M. J. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev* 1991; 13: 42-59.

Novagnost[®] *Mycoplasma pneumoniae* IgG

MYC/G

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Mycoplasma pneumoniae* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 psl.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių *Mycoplasma pneumoniae* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ar plazmoje (apdorotoje citratais).

Imunofermentinis testas atliekamas rankomis arba naudojant *BEP®III*, *BEP®2000* arba *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorių. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Mikoplazmos priskiriamos *Mollicutes* klasei, kurią sudaro trys skirtingos šeimos bei keturios gentys. Viena iš jų – *Mycoplasma*, kurioje yra daugiau kaip 60 rūšių. Mikoplazmos yra mažiausi žinomi gyvi organizmai (nuo 300 iki 500 nm skersmens), ir, skirtingai nuo įprastų bakterijų, jos neturi ląstelės sienelės. Mikoplazmos yra ekstraceliuliniai parazitai, dažniausiai pažeidžiantys gleivines ir galintys sukelti žmonių, gyvūnų, augalų ir audinių kultūrų infekcijas. *Mycoplasma pneumoniae* žmonėms dažniausiai yra kvėpavimo takų patogenas (obligatinis), pažeidžiantis nosiaryklę, gerklę, trachėją, bronchus, bronchioles ir alveoles.

Kitos mikoplazmos – *M. buccale*, *M. faucium*, *M. orale* ir *M. salivarium* yra burnos ertmės komensalai. *Mycoplasma hominis* ir *Ureaplasma urealyticum* dažniausiai randamos lytiniuose takuose ir gali būti oportunistiniai patogenai. *M. pneumoniae* iki šiol laikomas svarbiausiu sukėlėju šioje grupėje. *M. pneumoniae* sukeltos infekcijos registruojamos visame pasaulyje, sukėlėjo epidemiologija daugiausia tiriama JAV, Europoje ir Japonijoje. Infekcijoms didesnėse urbanizuotose zonose būdingas endeminis pobūdis, o epidemijų išplitimas stebimas įvairiais laiko intervalais. Paskaičiuota, kad *M. pneumoniae* sukelia 15–20 proc. visų pneumonijų, šios ligos dažnumas yra didžiausias tarp vaikų ir jaunų suaugusiųjų. 74 proc. *M. pneumoniae* sukeltų infekcijų yra besimptomės, infekcija gali kartotis. Manoma, kad natūraliai įgytas imuninetas *M. pneumoniae* yra trumpalaikis (2 – 3 metai).

Rūšys	Liga	Infekcijos mechanizmas
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Kvėpavimo sistemos ligos: Nuo besimptomės infekcijos iki faringito, bronchito, krupo, tracheobronchito, pneumonitomis pneumonijos.	Nėra žinoma, ar plinta daugiausia lašeline keliu, tiesiogiai ar netiesiogiai kontaktuojant, ar visais šiais būdais.

Infekciją galima diagnozuoti:

- mikroskopu;
- atliekant hemadsorbcijos reakciją, tetrazolino redukcijos reakciją (specifinė *M. pneumoniae*), komplemento surišimo reakciją;
- aptikri susidariusius antikūnus serologinėmis reakcijos ELISA metodu: komplemento surišimo (CF), neutralizacijos (N) ir hemagliutinacijos slopinimo (HAI) reakcijų pagalba. Aptikti antikūnus ir heksoninį antigeną ELISA metodu.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *Mycoplasma pneumoniae* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas ELISA (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami išgrynintais *Mycoplasma pneumoniae* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklinanti antikūnai žmogaus IgG susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *Mycoplasma pneumoniae* IgG antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

Novagnost® <i>Mycoplasma</i> IgG:	1 x 96
Novagnost® <i>Mycoplasma</i> IgG (testo plokštelė, padengta išgrynintais <i>Mycoplasma</i> antigenais):	1
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
Mikoplazmų kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Mikoplazmų ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Mikoplazmų kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Buferis IgG-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis *Novagnost* linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais *Novagnost* linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais *Novagnost* IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais *Novagnost* IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietoj *Novagnost* plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

Novagnost[®] *Mycoplasma* IgG testo plokštelė: Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgG konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgG, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

Mikoplazmų kontrolinis serumas, teigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

Mikoplazmų ribinės vertės kontrolinis serumas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

Mikoplazmų kontrolinis serumas, neigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojamą nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. Kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. *Novagnost®* ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Mycoplasma IgG testo plokštelė:

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
Novagnost® Mycoplasma IgG testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Mikoplazmų kontroliniai serumai (neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8 °C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP® III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis + 37 ± 1° C temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma +2 – +8° C temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo -iki -70° C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kr uopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Mycoplasma* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubavimas: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. (± 2 min.) $+20 - +25^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo $+20$ iki $+25^{\circ}\text{C}$), apsaugokite ją nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant **BEP® III**

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Mycoplasma* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostelės) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant **BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®**:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą).

BEP® 2000 / BEP 2000 Advance programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 /BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis < 0,200 ir < už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 < \text{ribinė vertė} < 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis > už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP® 2000*, *BEP 2000 Advance®* arba *BEP® III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,39 + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38

Ribinė vertė = 0,38

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost® vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė x 10 = [Novagnost® vienetai = U]

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost® vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: < 8,5 U

Teigiamas: > 11,5 U

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)
Teigiamas serumas	20	0,50	5,3
Teigiamas serumas	24	1,07	9,0
Tiriant skirtingais metodais	n	Vidutinis (U)	CV (%)
Teigiamas serumas	12	13,6	3,4
Teigiamas serumas	12	31,1	6,9

Specifiškumas

Diagnosticinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Jautrumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnosticinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Jautrumas yra > 95 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino.

Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti Siemens Healthcare Diagnostics prekių ženklai.

Novagnost[®] Mycoplasma pneumoniae IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100 su IgG
buferiniu tirpalu mėginiams skiesti

Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / 37° C $\pm 1^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / 37° C $\pm +25^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. JACOBS E. (1993) SEROLOGICALS DIAGNOSIS OF M. PEUMONIAE INFECTIONS: CURRENT PRODEDURES. CLIN INFECT DIS 17(SUPPL 1) 79-82
2. JACOBS E. (2002) MYCOPLASMA PNEUMONIAE DISEASE MANIFESTATIONS AND EPIDEMIOLOGY. IN: MOLECULAR BIOLOGY AND PATHOGENICITY OF MYCOPLASMAS. ED. RAZIN AND HERRMANN, KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBLISHER, NEW YORK, 519-530
3. VIKERFORS T., BRODIN G., GRANDIEN M., HIRSHBERG L., KROOK A. AND PETTERSSON C. A. (1988) DETECTION OF SPECIFIC IGG ANTIBODIES FOR THE DIAGNOSIS OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTIONS: A CLINICAL EVALUATION. SCAND J INFECT DIS 20 (6), 601-610
4. MARSTON B. J. ET AL. (1997) INCIDENCE OF COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA REQUIRING HOSPITALIZATION. ARCH INTERN MED 157, 1709-1718
5. SILLIS M. (1990) THE LIMITATIONS OF IGG ASSAYS IN THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTIONS. J MED MIRCBIOL 33, 253-258

Novagnost® Mycoplasma pneumoniae IgM

MYC/M

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Mycoplasma pneumoniae* IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 psl.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių *Mycoplasma pneumoniae* IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ar plazmoje (apdorotoje citratais). Imunofermentinis testas atliekamas rankomis arba naudojant *BEP®III*, *BEP®2000* arba *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorių. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Mikoplazmos priskiriamos *Mollicutes* klasei, kurią sudaro trys skirtingos šeimos bei keturios gentys. Viena iš jų – *Mycoplasma*, kurioje yra daugiau kaip 60 rūšių. Mikoplazmos yra mažiausi žinomi gyvi organizmai (nuo 300 iki 500 nm skersmens), ir, skirtingai nuo įprastų bakterijų, jos neturi ląstelės sienelės. Mikoplazmos yra ekstraceliuliniai parazitai, dažniausiai pažeidžiantys gleivines ir galintys sukelti žmonių, gyvūnų, augalų ir audinių kultūrų infekcijas. *Mycoplasma pneumoniae* žmonėms dažniausiai yra kvėpavimo takų patogenas (obligatinis), pažeidžiantis nosiaryklę, gerklę, trachėją, bronchus, bronchioles ir alveoles.

Kitos mikoplazmos – *M. buccale*, *M. faucium*, *M. orale* ir *M. salivarium* yra burnos ertmės komensalai. *Mycoplasma hominis* ir *Ureaplasma urealyticum* dažniausiai randamos lytiniuose takuose ir gali būti oportunistiniai patogenai. *M. pneumoniae* iki šiol laikomas svarbiausiu sukėlėju šioje grupėje. *M. pneumoniae* sukeltos infekcijos registruojamos visame pasaulyje, sukėlėjo epidemiologija daugiausia tiriama JAV, Europoje ir Japonijoje. Infekcijoms didesnėse urbanizuotose zonose būdingas endeminis pobūdis, o epidemijų išplitimas stebimas įvairiais laiko intervalais. Paskaičiuota, kad *M. pneumoniae* sukelia 15–20 proc. visų pneumonijų, šios ligos dažnumas yra didžiausias tarp vaikų ir jaunų suaugusiųjų. 74 proc. *M. pneumoniae* sukeltų infekcijų yra besimptomės, infekcija gali kartotis. Manoma, kad natūraliai įgytas imuninetas *M. pneumoniae* yra trumpalaikis (2 – 3 metai).

Rūšys	Liga	Infekcijos mechanizmas
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Kvėpavimo sistemos ligos: Nuo besimptomės infekcijos iki faringito, bronchito, krupo, tracheobronchito, pneumonitomis pneumonijos.	Nėra žinoma, ar plinta daugiausia lašeline keliu, tiesiogiai ar netiesiogiai kontaktuojant, ar visais šiais būdais.

Infekciją galima diagnozuoti:

- mikroskopu;
- atliekant hemadsorbcijos reakciją, tetrazolino redukcijos reakciją (specifinė *M. pneumoniae*), komplemento surišimo reakciją;
- aptikri susidariusius antikūnus serologinėmis reakcijos ELISA metodu: komplemento surišimo (CF), neutralizacijos (N) ir hemagliutinacijos slopinimo (HAI) reakcijų pagalba. Aptikti antikūnus ir heksoninį antigeną ELISA metodu.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis IgM klasės antikūnų *Mycoplasma pneumoniae* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas ELISA (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami išgrynintais *Mycoplasma pneumoniae* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklinėti antikūnai žmogaus IgM susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *Mycoplasma pneumoniae* IgM antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

Novagnost® <i>Mycoplasma</i> IgM	1 x 96
Novagnost® <i>Mycoplasma</i> IgM (testo plokštelė, padengta išgrynintais <i>Mycoplasma</i> antigenais):	1
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas (gautas iš ožkų)*:	2 x 10 ml
Mikoplazmų kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Mikoplazmų ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Mikoplazmų kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Buferis IgM-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1
* sudėtyje yra 0,2 % Bronidox L	
** sudėtyje yra < 0,1 % katono (Kathon)	
* praskiedus sudėtyje yra 0,1% Bronidox L	

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis Novagnost linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais Novagnost linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais Novagnost IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietoj Novagnost plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

Novagnost® *Mycoplasma* IgM testo plokštelė: Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgM konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų ožkos antikūnų žmogaus IgM, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų raudonų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

Mikoplazmų kontrolinis serumas, teigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

Mikoplazmų ribinės vertės kontrolinis serumas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

Mikoplazmų kontrolinis serumas, neigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgM mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, antikūnų žmogaus IgG (Rf absorbento), stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų žalių dažų, paruoštas naudoti. Papildomo Rf absorbcijos etapo nereikia, nes Rf absorbento yra buferiniame tirpale IgM mėginiui skiesti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojimui nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.
2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.
3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.
4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.
5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.
6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.
8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.
9. Kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.
10. Pirmą kartą atidare ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netašykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. *Novagnost*® ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite. Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Mycoplasma IgM testo plokštelė:

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido kompleksas. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
<i>Novagnost</i> ® <i>Mycoplasma</i> IgM testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgM mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Mikoplazmų kontroliniai serumai (neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8 °C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

	praskiestas 1 +19	nuo +20 iki +25° C	pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP® III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgM mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Mycoplasma* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį.

Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubavimas: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 μl praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

- 6. Konjugato išpilstymas** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.
- 7. Konjugato inkubavimas:** inkubuokite 30 min. ($\pm$ 2 min.) +20 – +25° C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
- 8. Plovimas** Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.
- 9. Išpilstykite substratą:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.
- 10. Substrato inkubavimas:** Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo +20 iki +25° C), apsaugokite ją nuo šviesos.
- 11. Reakcijos sustabdymas:** Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.
- 12. Matavimas:** Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

- 1. Mėginio praskiedimas:** Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgM mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 100µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
- 2. Testo atlikimo schema:** Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
- 3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete:** Į *Mycoplasma* IgM testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juosteles) reikia užpildyti vandeniu.
BEP® III programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000/ BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą).
BEP® 2000 / BEP 2000 Advance programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 /BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriaai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39$ + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė x 10 = [Novagnost[®] vienetai = U]

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32$ U (Novagnost[®] vienetų)

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5$ U

Teigiamas: $> 11,5$ U

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)
Teigiamas serumas	31	0,99	2,9
Teigiamas serumas	22	0.76	9.2
Tiriant skirtingais metodais	n	Vidutinis (U)	CV (%)
Teigiamas serumas	12	21,6	4,8
Teigiamas serumas	12	13.3	7.8

Specifiškumas

Diagnosticinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnosticinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Jautrumas yra 94,4 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino.

Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] Mycoplasma pneumoniae IgM testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100 su IgM
buferiniu tirpalu mėginiams skiesti

Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm$ 5' / 37° C $\pm$ 1° C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm$ 2' / 37° C $\pm$ +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. JACOBS E. (1993) SEROLOGICALS DIAGNOSIS OF M. PEUMONIAE INFECTIONS: CURRENT PRODEDURES. CLIN INFECT DIS 17(SUPPL 1) 79-82
2. JACOBS E. (2002) MYCOPLASMA PNEUMONIAE DISEASE MANIFESTATIONS AND EPIDEMIOLOGY. IN: MOLECULAR BIOLOGY AND PATHOGENICITY OF MYCOPLASMAS. ED. RAZIN AND HERRMANN, KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBLISHER, NEW YORK, 519-530
3. VIKERFORS T., BRODIN G., GRANDIEN M., HIRSHBERG L., KROOK A. AND PETTERSSON C. A. (1988) DETECTION OF SPECIFIC IGM ANTIBODIES FOR THE DIAGNOSIS OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTIONS: A CLINICAL EVALUATION. SCAND J INFECT DIS 20 (6), 601-610
4. MARSTON B. J. ET AL. (1997) INCIDENCE OF COMMUNITY ACQUIRED PNEUMONIA REQUIRING HOSPITALIZATION. ARCH INTERN MED 157, 1709-1718
5. SILLIS M. (1990) THE LIMITATIONS OF IGM ASSAYS IN THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTIONS. J MED MIRCBIOL 33, 253-258

Novagnost[®] Toxocara canis IgG

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Toxocara canis* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus kraujo serume ir plazmoje (apdorotoje citratais).

Anglų kalba: nuo 2 iki 10 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 10 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 63 psl.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys imunofermentiniam tyrimui kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *Toxocara canis* pagrindinių specifinių IgG antikūnų nustatymui žmogaus kraujo serume arba plazmoje (apdorotoje citratais).

Imunofermentinis testas atliekamas rankomis arba naudojant *BEP®III*, *BEP®2000* arba *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorių. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Toxocara canis (askaridė) yra parazitinis nematodas (apvalioji kirmėlė), dažnai randama šunų žarnyne. Žmonės yra tarpiniai šeimininkai, kurie užsikrečia suvalgę parazitų kiaušinėlių, esančių užterštame dirvožemyje. Užsikrėtus iš kiaušinėlių išsivysta lervos, kurios prasiskverbia per žarnų sienelę ir per kraują pasklinda į įvairius audinius (kepenis, širdį, plaučius, smegenis, raumenis, akis). Nors lervos šiose vietose toliau nesivysto, jos gali sukelti sunkių vietos reakcijų, sudarančių toksokarozės pagrindą.

Daugumoje atvejų toksokarų sukeltos infekcijos yra nesunkios, ir daug žmonių, ypač suaugusiųjų, užsikrėtusių nedideliu lervų (nesubrendusių kirmėlių) kiekiu gali nepajusti jokių simptomų. Labai sunkūs atvejai stebimi retai, dažniau vystosi mažiems vaikams, dažnai žaidžiantiems užterštoje aplinkoje, ar kuriems į burną patenka šunų išmatomis užteršto purvo. Dvi pagrindinės toksokarozės klinikinės formos yra akių (į akis migruojanti lerva, OLM), galinti sukelti aklumą (kiekvienais metais daugiau kaip 700 toksokaromis užsikrėtusių žmonių visam laikui praranda dalį regos), ir visceralinė (į vidaus organus migruojanti lerva, VLM), sukelianti organizmo vidaus organų ar centrinės nervų sistemos paabrėžimą.

Rūšys	Liga	Simptomai	Infekcijos mechanizmas
<i>Toxocara canis</i>	Toksokarozė, į akis migruojanti lerva (OLM) Toksokarozė, į vidaus organus migruojanti lerva (VLM)	Eozinofilija, uždegimas ir rando susidarymas tinklainėje. Karščiavimas, kosulys, astma ar pneumonija.	Infekcija išsivysto atsitiktinai nurijus toksokarų kiaušinėlių su lervomis, esančių dirvožemyje ar ant kitų užterštų paviršių.

Parazitų buvimą arba infekciją galima nustatyti:

- ☐ mikroskopu;
- ☐ atliekant serologinius tyrimus: randant antikūnų imunofermentiniu tyrimo metodu (*ELISA*).

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *Toxocara canis* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas *ELISA* (fermentais žymėtos imunisorbentinė analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *Toxocara canis* antigenais. Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklintas A baltymo konjugatas susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiems prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksidą) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja.

Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *Toxocara canis* antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti ELISA mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

<i>Novagnost® Toxocara</i> IgG:	1 x 96
<i>Novagnost® Toxocara</i> IgG (tasto plokštelė, padengta sintetiniais <i>Toxocara canis</i> antigenais):	1
A baltymo konjugatas (gautas iš <i>Staphylococcus aureus</i>)*:	2 x 10 ml
Toksokarų kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Toksokarų ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Toksokarų kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus) **:	1 x 2 ml
Buferis IgG mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1
* sudėtyje yra 0,2 % <i>Bronidox L</i>	
** sudėtyje yra < 0,1 % katono (<i>Kathon</i>)	
* praskiedus sudėtyje yra 0,1% <i>Bronidox L</i>	

Toliau išvardyti reagentai yra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl jų negalima naudoti su kitomis *Novagnost* linijos produktų partijomis ar rinkiniais: rinkinio kontroliniai tirpalai, konjugatas, mikroplokštelė.

Toliau išvardyti reagentai nėra specifiniai gaminio partijai ir rinkiniui, todėl juos galima naudoti su visais *Novagnost* linijos rinkiniais: reakcijos sustabdymo tirpalas, plovimo tirpalas, TMB substrato tirpalas.

Buferinis tirpalas IgG mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais *Novagnost* IgA ir IgG rinkiniais.

Buferinis tirpalas IgM mėginiui skiesti nėra specifinis gaminio partijai, jį galima naudoti su visais *Novagnost* IgM rinkiniais.

Nenaudokite buferinio tirpalo IgM mėginiui skiesti vietoj buferinio tirpalo IgG ar IgA mėginiams skiesti, ir atvirkščiai.

Vietai *Novagnost* plovimo tirpalo galima naudoti Enzygost plovimo tirpalą POD.

Sudėtis

***Novagnost® Toxocara* IgG testo plokštelė:** Laužomos juostelės yra padengtos sintetiniais toksokarų antigenais ir paruoštos naudoti.

Baltymo A konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėto baltymo A, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

Toksokarų kontrolinis serumas, teigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

Toksokarų ribinės vertės kontrolinis serumas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

Toksokarų kontrolinis serumas, neigiamas: 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio ($\text{pH } 7,2 \pm 0,2$) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojamą nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.
2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.
3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.
4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.
5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.
6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.
7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.
8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.
9. Kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.
10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.
11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netašykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.
12. *Novagnost*[®] ELISA yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite. Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

Toxocara IgG testo plokštelė:

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	5 dienos
<i>Novagnost</i> [®] <i>Toxocara</i> IgG testas: plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Baltymo A konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Toksokarų kontroliniai serumai (neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] *III*: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] *2000* / *BEP 2000 Advance*[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis + 37 ± 1° C temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo ar plazmos (apdoroto citratu) mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma +2 – +8° C temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo -iki -70° C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius.

Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Mycoplasma* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį.

Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.

4. Inkubavimas: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos. Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl baltymo A konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. (± 2 min.) $+20 - +25^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo $+20$ iki $+25^{\circ}\text{C}$), apsaugokite ją nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami Vortex maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *Toxocara* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevysiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostes) reikia užpildyti vandeniu.

BEP[®] III programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP[®] III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost[®]* produktais.

Procedūra naudojant *BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP[®] 2000/ BEP 2000 Advance[®]* naudojimo vadovą).

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP[®] 2000 /BEP 2000 Advance[®]* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost[®]* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis < 0,200 ir < ribinę vertę
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 < \text{ribinė vertė} < 1,300$
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis > ribinę vertę

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,39 + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis 0,37 = 0,76 / 2 = 0,38

Ribinė vertė = 0,38

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2–4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost® vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10$ = [Novagnost® vienetai = U]

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32$ U (Novagnost® vienetai)

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: < 8,5 U

Teigiamas: > 11,5 U

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Tikslumas

Tiriant tuo pačiu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)	
Teigiamas serumas	12	1,017		2,6
Tiriant skirtingu metodu	n	Vidutinis (E)	CV (%)	
Teigiamas serumas	5	1,049		8,1

Specifiškumas

Diagnosticinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnosticinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Jautrumas yra > 95 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš gelatą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino.

Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.
6. Negalima atmesti sintetinių antigenų kryžminės reakcijos su antikūnais *Ascaris lumbricoides* ir *Schistosoma*.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] Toxocara IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100 su IgG
buferiniu tirpalu mėginiams skiesti

Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / 37° C $\pm 1^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / 37° C $\pm +25^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Literatūros sąrašas

1. Glickman L., Schantz P., Grieve R. "Toxocariasis". Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Vol. 1, Helminthic Diseases. Ed. Walls and Schantz. Academic press, 1986. pp. 201-231.
2. Schantz P. Toxocara Larva Migrans Now. Am J Trop Med Hyg. Vol. 41 (Sup. 3), 1989, pp. 21-34.
3. Jacquier P. et al. Immunodiagnosis of toxocariasis in humans: Evaluation of a New Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit. J. Clin. Micro. Vol. 29 #9, Sept. 1991, pp. 1831-1835.
4. Carlier Y. et al. The use of an Excretory-Secretory Antigen for an ELISA Specific Serodiagnosis of Visceral Larva Migrans. Biomedicine. Vol. 36, 1982, pp. 39-42.
5. Brunello F. Falagiani P., Genchi C. Enzyme Immunoassay (ELISA) for the Detection of Specific IgG Antibodies to Toxocara canis ES Antigens. Boll. Ist. sieroter. Milan. Vol. 65#1, 1986, pp. 54-60.
6. Josephson S. L. Toxocariasis. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases - Principles and Practices, Vol. 1, 1988, pp. 993-997.

Novagnost® EBV-VCA IgG

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam *EBV-VCA* IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 67 psl.

.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių EBV-VCA IgG antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume.

Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Eipštein Baro virusas (EBV) yra herpes virusų (Gama pogrupio, DNR virusas 120-200 nm) šeimos narys. Virusas plačiai paplitęs visame pasaulyje ir daugelis žmonių juo užsikrečia gyvenimo cikle. Virusų paplitimo beveik neįmanoma sustabdyti dėl to kad daugelis žmonių virusą nešioja ir platina per visą gyvenimo ciklą. Naujagimiai virusu gali užsikrėsti tuoj pat kai tik sunyksta motinos antikūnų apsauga. Naujagimių infekcija beveik neturi simptomų. Infekcinė mononukleozė beveik visada nėra letali. Nėra žinomų asociacijų tarp aktyvios EBV infekcijos ir problemų nėštumo metu. Infekcinės mononukleozės simptomai paprastai išnyksta per 1 ar 2 mėn, EBV pasilieka gerklės arba kraujo ląstelėse visą gyvenimą. Periodiškai virusas gali reaktyvuotis. Reaktyvacija paprastai atsiranda be ligos požymių.

Rūšis	Liga	Infekcijos mechanizmas	Infekcijos mechanizmas
Epštein Bar virusas	Infekcinė mononukleozė	Karščiavimas, skaudanti gerklė, padidėję limfmazgiai	Žmogus žmogui transmisija EBV reikia artimo kontakto su infekuoto žmogaus seilėmis, tačiau virusas taip pat randamas ir sveikų žmonių seilėse

Viruso būvimą galima nustatyti:

- PCR
- Serologija: „mono spot“ testas, antikūnų nustatymas ELISA metodu

Optimali serologinių testų kombinacija susideda iš trijų markerių titravimo: IgM ir IgG prieš kapsidinį antigeną (VCA) ir antikūnius prieš EBV branduolio antigeną (EBNA). IgM prieš VCA atsiranda ankstyvoje infekcijoje ir pranyksta 4 – 12 savaitę. IgG prieš VCA atsiranda ūmioje fazėje, pika 2-4 savaitės ir sunyksta lėtai ir egzistuoja visą gyvenimą.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *EBV-VCA* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas *ELISA* (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *EBV-VCA* sintetiniu antigenu (p18). Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklinėti antikūnai žmogaus IgG susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksidą) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *anti-EBV-VCA* IgG antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti *ELISA* mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgG</i> :	1 x 96
<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgG</i> (testo plokštelė, padengta sintetiniu p18 peptidu):	1
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
Buferis IgG-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Sudėtis

***Novagnost*[®] *EBV-VCA IgG* testo plokštelė:** Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgG konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgG, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, teigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

***EBV-VCA* ribinės vertės kontrolinis serumas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, neigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojamą nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. **Novagnost® ELISA** yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

EBV-VCA IgG testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	Per naktį
<i>Novagnost</i> [®] EBV-VCA IgG testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgG mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgG konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
EBV-VCA kontroliniai serumai neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius. Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.
4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 μl praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl antikūnų žmogaus IgG konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. (± 2 min.) $+20 - +25^{\circ}$ C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo $+20$ iki $+25^{\circ}$ C), apsaugokite ją nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA* IgG testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad neviseiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostes) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39$ + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2– 4 savaičių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10 = [\text{Novagnost[®] Units} = \text{U}]$

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SEROLOGIJA

Antikūniai EBV			Infekcijos stadija
VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG	
-	-	-	EBV neigiamas
-	+	+	Buvusi EBV infekcija
+	+-	-	EBV infekcija ankstyvi stadija
-+	+	-+	EBV infekcija pereinamas laikotarpis
-	+	+	EBV infekcija sveikimo laikotarpis
-+	+	+	EBV infekcija reaktyvacija

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Specifiškumas

Diagnostinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Jautrumas

Diagnostinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra > 95 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] EBV-VCA IgG testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgG buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / 37° C $\pm 1^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / nuo +20 iki +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas

Novagnost® EBV-VCA IgM

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam EBV-VCA IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume

Anglų kalba: nuo 2 iki 11 puslapio

Testo procedūrų santrauka pateikiama 11 puslapyje.

Literatūros sąrašas pateikiamas 71 psl.

.

Naudojimo paskirtis

Rinkinys kokybiniam ir pusiau kiekybiniam specifinių EBV-VCA IgM antikūnų nustatymui imunofermentiniu metodu žmogaus serume.

Imunofermentinis tyrimas atliekamas rankomis arba atitinkamai panaudojant *BEP®III*, *BEP®2000* or *BEP 2000 Advance® ELISA* analizatorius.. Testas sukurtas tirti individualius mėginius, o ne mėginius, sudarytus iš kelių asmenų tiriamosios medžiagos. Produktas skirtas naudoti tik *in vitro* sąlygomis.

Santrauka ir paaiškinimai

Eipštein Baro virusas (EBV) yra herpes virusų (Gama pogrupio, DNR virusas 120-200 nm) šeimos narys. Virusas plačiai paplitęs visame pasaulyje ir daugelis žmonių juo užsikrečia gyvenimo cikle. Virusų paplitimo beveik neįmanoma sustabdyti dėl to kad daugelis žmonių virusą nešioja ir platina per visą gyvenimo ciklą. Naujagimiai virusu gali užsikrėsti tuoj pat kai tik sunyksta motinos antikūnų apsauga. Naujagimių infekcija beveik neturi simptomų. Infekcinė mononukleozė beveik visada nėra letali. Nėra žinomų asociacijų tarp aktyvios EBV infekcijos ir problemų nėštumo metu. Infekcinės mononukleozės simptomai paprastai išnyksta per 1 ar 2 mėn, EBV pasilieka gerklės arba kraujo ląstelėse visą gyvenimą. Periodiškai virusas gali reaktyvuotis. Reaktyvacija paprastai atsiranda be ligos požymių.

Rūšis	Liga	Infekcijos mechanizmas	Infekcijos mechanizmas
Epštein Bar virusas	Infekcinė mononukleozė	Karščiavimas, skaudanti gerklė, padidėję limfmazgiai	Žmogus žmogui transmisija EBV reikia artimo kontakto su infekuoto žmogaus seilėmis, tačiau virusas taip pat randamas ir sveikų žmonių seilėse

Viruso būvimą galima nustatyti:

- PCR
- Serologija: „mono spot“ testas, antikūnų nustatymas ELISA metodu

Optimali serologinių testų kombinacija susideda iš trijų markerių titravimo: IgM ir IgG prieš kapsidinį antigeną (VCA) ir antikūnius prieš EBV branduolio antigeną (EBNA). IgM prieš VCA atsiranda ankstyvoje infekcijoje ir pranyksta 4 – 12 savaitę. IgG prieš VCA atsiranda ūmioje fazėje, pika 2-4 savaitės ir sunyksta lėtai ir egzistuoja visą gyvenimą.

Metodo principas

Kokybinis ir kiekybinis antikūnų *EBV-VCA* nustatymas imunofermentiniu metodu grindžiamas *ELISA* (fermentais žymėtos imunosorbentinės analizės) technika.

Šulinėliai mikrotitravimui pritaikytose juostelėse yra iš anksto padengiami *EBV-VCA* sintetiniu antigenu (p18). Mėginyje esantys specifiniai antikūnai susijungia su prie mikroplokštelės prilipusiais antigenais. Krieno peroksidaze (HRP) paženklininti antikūnai žmogaus IgM susijungia su antigeno / antikūno kompleksais, prisitvirtinusiais prie kietosios fazės. Susidarę imuniniai kompleksai aptinkami spalvinės reakcijos pagalba. Konjugate esantis fermentas paverčia TMB substrato tirpalą (tetrametilbenzidiną ir vandenilio peroksida) mėlynos spalvos reakcijos produktu. Reakcija nutraukiama įlašinant reakciją sustabdančio tirpalo, nuo kurio reakcijos tirpalas pageltonuoja. Geltonos spalvos intensyvumas yra proporcingas mėginyje esančių specifinių *anti-EBV-VCA* IgM antikūnų kiekiui. Geltonos spalvos intensyvumą nesunkiai galima išmatuoti *ELISA* mikroplokštelių skaitytuvu, naudojant 450 nm ilgio bangą.

Reagentai

Rinkinyje pateikiamos medžiagos

<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgM</i> :	1 x 96
<i>Novagnost</i> [®] <i>EBV-VCA IgM</i> (testo plokštelė, padengta sintetiniu p18 peptidu):	1
Antikūnų žmogaus IgMkonjugatas (gautas iš triušių)*:	2 x 10 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, teigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> ribinės vertės kontrolinis serumas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
<i>EBV-VCA</i> kontrolinis serumas, neigiamas (žmogaus)**:	1 x 2 ml
Buferis IgM-mėginiui skiesti**:	1 x 100 ml
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	1 x 15 ml
Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)***:	1 x 50 ml
TMB substrato tirpalas:	1 x 15 ml
Lipnus lapelis:	1
Naudojimo instrukcijos	1

* sudėtyje yra 0,2 % *Bronidox L*

** sudėtyje yra < 0,1 % katono (*Kathon*)

* praskiedus sudėtyje yra 0,1% *Bronidox L*

Sudėtis

***Novagnost*[®] *EBV-VCA IgM* testo plokštelė:** Laužomos juostelės yra padengtos išgrynintais antigenais ir paruoštos naudoti.

Antikūnų žmogaus IgM konjugatas: 2 x 10 ml buteliukai, kuriuose yra peroksidaze žymėtų triušio antikūnų žmogaus IgM, buferio, stabilizatoriaus, konservantų ir inertiškų mėlynų dažų, paruoštas naudoti, su baltu kamšteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, teigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su raudonu dangteliu.

***EBV-VCA* ribinės vertės kontrolinis serumas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su žaliu dangteliu.

***EBV-VCA* kontrolinis serumas, neigiamas:** 1 buteliuke yra 2 ml kontrolinio serumo; geltonos spalvos; paruoštas naudoti; su mėlynu dangteliu.

IgG mėginio buferinis skiediklis: 1 buteliuke yra 100 ml fosfatinio buferio, stabilizatoriaus, konservanto ir inertiškų geltonų dažų, paruoštas naudoti.

Reakcijos sustabdymo tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml paruoštos naudoti 0,2 mol/l sieros rūgšties, su raudonu kamšteliu.

Plovimo tirpalas: 1 buteliuke yra 50 ml 20 kartų skiedžiamo koncentruoto buferio (pH 7,2 ± 0,2) šulinėliams plauti.

TMB substrato tirpalas: 1 buteliuke yra 15 ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB); paruoštas naudoti, su juodu dangteliu.

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

1. Vadovaujantis Europos direktyvos 98/79/EB 1 straipsnio 2b dalimi, medicininių prietaisų, skirtų *in vitro* diagnostikai naudojamą nustato gamintojas, užtikrindamas produkto tinkamumą, veikimą ir saugumą. Todėl būtina griežtai laikytis naudojimo instrukcijoje pateiktų testo procedūrų aprašymo, informacijos, atsargumo priemonių ir perspėjimų. Testų rinkinius naudojant su panašiais analizatoriais, juos reikia patikrinti ir patvirtinti jų tinkamumą. Bet kokie struktūros, sudėties ar testo atlikimo procedūros pakeitimai ar naudojimas su kitais, gamintojo nepatvirtintais produktais, draudžiamas; už tokius pakeitimus atsako pats vartotojas. Tokiais atvejais gamintojas neatsako už gautus klaidinančius rezultatus ar incidentus. Gamintojas neatsako už rezultatus, gautus vizualiai tiriant paciento mėginius.

2. Skirtas naudoti tik diagnostikai *in vitro* sąlygomis.

3. Visi gaminant šiuos reagentus naudojami iš žmogaus organizmo gauti komponentai buvo patikrinti dėl antikūnų ŽIV 1/2, antikūnų CHV ir HBsAG; šių testų rezultatai buvo neigiami. Nepaisant to, visos medžiagos turi būti laikomos kaip potencialiai užkrėstos ir atitinkamai tvarkomos.

4. Vienam testui atlikti nenaudokite skirtingų gamybos partijų reagentų ar juostelių.

5. Su šio testo rinkinio reagentais negalima naudoti kitų gamintojų reagentų.

6. Nenaudokite reagentų pasibaigus etiketėje nurodytam tinkamumo laikui.

7. Naudokite tik švarius pipečių antgalius, dispenserius ir laboratorinius indus.

8. Kad išvengtumėte kryžminės taršos, nesukeiskite reagentų buteliukų kamštelių.

9. kad reagentai nenugaruotų ir neužsiterštų mikroorganizmais, juos panaudoję nedelsdami buteliukus sandariai uždarykite kamšteliais.

10. Pirmą kartą atidarę ir vėliau laikant konjugato ir kontrolinių tirpalų buteliukus prieš naudojant patikrinkite, ar jie neužteršti mikroorganizmais.

11. Kad išvengtumėte kryžminės taršos ir klaidingai didesnių rezultatų verčių, pipete išpilstydami paciento mėginius ir konjugatą jų netaškykite, o atsargiai sulašinkite į šulinėlių dugną.

12. **Novagnost® ELISA** yra skirtas naudoti tik patirties įgijusiems darbuotojams, susipažinusiems su geros laboratorinės praktikos reikalavimais.

PERSPĖJIMAS: Sieros rūgštis dirgina akis ir odą! Patekus į akis jas reikia kruopščiai praplauti vandeniu ir kreiptis į gydytoją.

Reagentų paruošimas

Prieš pradėdami atlikti testą visus reagentus, mėginius ir kontrolinius tirpalus atsineškite į kambario temperatūros aplinką (nuo +20 iki +25° C), aliuminio folijos nuo plokštelės nenuimkite.

Jeigu reagentus ar darbinius reagentų tirpalus reikia sumaišyti, venkite putų susidarymo.

EBV-VCA IgM testo plokštelė

Paėmus reikiamą juostelių skaičių likusias juosteles reikia nedelsiant uždengti folijos lapeliu įdedant rinkinyje esančią drėgmę sugeriančią medžiagą.

Plovimo tirpalas (skiedžiamas 20 kartų)

Plovimo skystį praskieskite 1+19; pvz., 10 ml plovimo tirpalo + 190 ml šviežio ir mikroorganizmais neužteršto du kartus distiliuoto vandens. Praskiestas buferis yra stabilus 5 dienas jį laikant kambario temperatūroje. Kristalai tirpale ištirpsta jį pašildžius vandens vonioje iki +37° C. Pirmą kartą atidarius koncentruotą tirpalą galima naudoti iki tinkamumo laiko pabaigos, laikant nuo +2 iki +8° C temperatūroje.

TMB substrato tirpalas:

Buteliuke yra 15 ml tetrametilbenzidino / vandenilio peroksido komplekso. Reagentą reikia laikyti nuo šviesos apsaugotoje vietoje. Tirpalas turi būti bespalvis arba švelniai melsvo atspalvio. Jeigu substratas pamėlynuoja, jis gali būti užterštas, todėl jį reikia išmesti.

1 lentelė Laikymas ir stabilumas

Medžiaga / reagentas	Būsena	Laikymas	Stabilumas*
Tiriamasis mėginys	praskiestas 1 + 100	nuo +2 iki +8° C	Per naktį
<i>Novagnost</i> [®] EBV-VCA IgM testo plokštelė, likusios juostelės	Atidarius	nuo +2 iki +8° C maišelyje su drėgmę sugeriančia medžiaga	iki tinkamumo laiko pabaigos
IgM mėginio buferinis skiediklis	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
Antikūnų žmogaus IgM konjugatas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
EBV-VCA kontroliniai serumai neigiamas, teigiamas, ribinės vertės)	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos
TMB substrato tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C, saugant nuo šviesos	iki tinkamumo laiko pabaigos
Plovimo tirpalas:	Atidarius praskiestas 1 +19	nuo +2 iki +8° C nuo +20 iki +25° C	iki tinkamumo laiko pabaigos 5 dienos
Reakcijos sustabdymo tirpalas:	Atidarius	nuo +2 iki +8° C	iki tinkamumo laiko pabaigos

* visus komponentus reikia sunaudoti vėliausiai iki tinkamumo laiko pabaigos.

Reikalingos bet netiekiamos medžiagos

BEP[®] III: Automatiniam reagentų išpilstymui, plovimui ir testo įvertinimui.

BEP[®] 2000 / BEP 2000 Advance[®]: Visiškai automatizuotam testo atlikimui ir įvertinimui.

Pipetės: Vienkanalės ar daugiakanalės, fiksuoto ar keičiamo tūrio pipetės.

Inkubatorius: Inkubatorius, palaikantis $+37 \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūrą.

Visi testą atliekant naudojami prietaisai turi būti patikrinti ir pripažinti tinkamais.

Tiriamoji medžiaga

Tyrimui su šiuo testo rinkiniu naudokite žmogaus kraujo serumo mėginius, paimtus taikant įprastus laboratorinius metodus. Jeigu testas atliekamas per dienas nuo mėginio paėmimo, tiriamoji medžiaga turi būti laikoma $+2 - +8^\circ \text{C}$ temperatūroje; kitais atvejais mėginiai turi būti laikomi šaldiklyje (nuo $-$ iki -70°C temperatūroje). Jeigu mėginiai laikomi užšaldyti, prieš praskiedžiant atitirpintus mėginius reikia gerai išmaišyti. Venkite pakartotinai užšaldyti ir atitirpinti mėginius. Nerekomenduojama mėginius inaktyvuoti karščiu.

Procedūra

Rankomis atliekama procedūra

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 μl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridedant 10 μl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.
2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.
3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA IgM* testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 μl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 μl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Pabaigus lašinti pipete tiriamąją plokštelę reikia uždengti prilimpančia folija ir nedelsiant įdėti į inkubatorių.
4. Inkubacija: Inkubuokite 60 min. (± 5 min.) $+37^\circ \text{C} \pm 1^\circ \text{C}$ temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.
5. Plovimas Nuimkite foliją, iš šulinėlių išsiurbkite skystį ir 3 kartus praplaukite įlašindami 300 μl praskiesto plovimo tirpalo. Venkite turinį iš reakcijos šulinėlių perpilti per kraštus. Mirkimo laikas tarp plovimo ciklų turi būti > 5 sek. Pabaigę ir prieš pradėdami sekantį etapą kruopščiai pašalinkite likusį skystį juostelėmis patapšnodami ant skystį sugeriančio popieriaus.

Pastaba: Plovimas yra labai svarbus etapas! Nepakankamai išplovus testo tikslumas suprastėja, o gauti absorbcijos rodiklių vertės yra klaidingai aukštos.

Pabaigus plovimo ciklus nedelsdami pradėkite lašinti sekantį reagentą (nes šulinėliai gali išdžiūti).

6. Konjugato išpilstymas Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl antikūnų žmogaus IgM konjugato. Tada testo plokštelę užklijuokite nenaudotu folijos lapeliu.

7. Konjugato inkubavimas: inkubuokite 30 min. (± 2 min.) $+20 - +25^{\circ}$ C temperatūroje, o po to nedelsdami pradėkite plovimo procedūrą.

8. Plovimas Plaukite, kaip aprašyta 5-ajame žingsnyje.

9. Išpilstykite substratą: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl TMB substrato tirpalo.

10. Substrato inkubavimas: Pabaigę sulašinti substratą nedelsdami plokštelę tiksliai 15 minučių inkubuokite kambario temperatūroje (nuo $+20$ iki $+25^{\circ}$ C), apsaugokite ją nuo šviesos.

11. Reakcijos sustabdymas: Į kiekvieną šulinėlį įlašinkite 100 µl reakciją stabdančio tirpalo, laikydamiesi tokio pat laiko režimo kaip pilstydami substratą.

12. Matavimas: Matavimus atlikite fotometru 450 nm ilgio banga per 30 minučių. Rekomenduojamas referentinės bangos ilgis yra 650 nm.

Procedūra naudojant *BEP® III*

1. Mėginio praskiedimas: Visus mėginius reikia praskiesti 1+100 su buferiniu tirpalu IgG mėginiui skiesti, t. y., pipete į buteliuką įlašinant 1000 µl buferinio tirpalo mėginiui skiesti ir pridėdant 10 µl mėginio. Kruopščiai išmaišykite panaudodami *Vortex* maišytuvą. Kontroliniai serumai yra paruošti naudoti, jų skiesti negalima.

2. Testo atlikimo schema: Reikiamas mikroplokštelės šulinėlių kiekis pasirenkamas atsižvelgiant į tiriamų mėginių kiekį bei šulinėlių, reikalingų kontroliniams serumams (neigiamam, 2 ribinės vertės ir teigiamam), kiekį. Galima tirti vieną mėginio bandinį. Įprastai rekomenduojama tirti du mėginio bandinius.

3. Mėginių ir kalibracinių tirpalų išpilstymas pipete: Į *EBV-VCA* IgM testo juostelės šulinėlius A1 – D1 pipete sulašinkite po 100 µl kontrolinio serumo (neigiamo, 2 ribinės vertės ir teigiamo). Po to į kitus šulinėlius sulašinkite po 100 µl kiekvieno mėginio. Kiekvienam mėginiui naudokite naują antgalį. Viena testo plokštelė turi būti sulašinama ne per ilgesnį kaip 15 minučių laikotarpį. Visi kiti veiksmai automatiškai bus atlikti prietaise. Plokštelės folijos lapeliu **neužklijuokite**. Atkreipkite dėmesį, kad nevisiškai užpildytose plokštelėse mažiausiai pusę tuščių šulinėlių (6 testo juostes) reikia užpildyti vandeniu. *BEP® III* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® III* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Procedūra naudojant *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®*:

Analizatorius automatiškai išpilsto mėginius ir atlieka kitas testo procedūras (žr. *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®* naudojimo vadovą). *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance* programinėje įrangoje numatytas inkubavimo laikas gali būti kitoks, nei IFU, tačiau *BEP® 2000 / BEP 2000 Advance®* įranga buvo patikrinta ir pripažinta tinkama dirbti su *Novagnost®* produktais.

Vidaus kokybės kontrolė

Testo patikrinimas

Kad testas būtų pripažintas patikimu, jis turi atitikti toliau išvardytus kriterijus:

- ☐ neigiama kontrolė šulinėlyje A1: absorbcijos rodiklis $< 0,200$ ir $<$ už ribinę vertę;
- ☐ ribinės vertės kontrolė šulinėliuose B1 ir C1: absorbcijos rodiklis $0,150 <$ ribinė vertė $< 1,300$;
- ☐ teigiama kontrolė šulinėlyje D1: Absorbcijos rodiklis $>$ už ribinę vertę.

Jeigu testas šių kriterijų neatitinka, jo rezultatai yra nepatikimi, todėl testą būtina pakartoti.

Analizės rezultatų paskaičiavimas

Jeigu naudojami *BEP[®] 2000*, *BEP 2000 Advance[®]* arba *BEP[®] III* i, vertinimai atliekami automatiškai. Prašome vadovautis atitinkamais naudojimo vadovais. Tolesni skyriaai taikytini tiems atvejams, kai matavimai atliekami nenaudojant programinės įrangos.

Rezultatų paskaičiavimas

Automatiniam rezultatų nuskaitymui ir paskaičiavimui gali būti naudojamos visos turimos tinkamos kompiuterinės programos.

Ribinė vertė yra vidutinė kontrolinio ribinės vertės serumo absorbcijos rodiklio vertė.

Pavyzdys:

Ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,39$ + ribinės vertės kontrolės absorbcijos rodiklis $0,37 = 0,76 / 2 = 0,38$

Ribinė vertė = $0,38$

Rezultatų interpretavimas

Mėginiai laikomi TEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę.

Mėginiai, kurių absorbcijos rodiklis yra mažiau kaip 15 proc. didesnis už ribinę vertę, negali būti laikomi akivaizdžiai teigiamais ar neigiamais.

→ pilkoji zona

Rekomenduojama testą pakartoti po 2– 4 savaitių tiriant naujai paimtą mėginį. Jeigu antrojo testo rezultatas taip pat patenka į pilkąją zoną, mėginys turi būti laikomas NEIGIAMU.

Mėginiai laikomi NEIGIAMAIS, jeigu absorbcijos rodiklis yra daugiau kaip 15 proc. mažesnis už ribinę vertę.

Rezultatai Novagnost[®] vienetais

Paciento (vidutinė) absorbcijos reikšmė $\times 10 = [\text{Novagnost[®] Units} = \text{U}]$

Ribinė vertė

Pavyzdys: $\frac{1,216 \times 10}{0,38} = 32 \text{ U (Novagnost[®] vienetai)}$

Ribinė vertė: 10 U

Pilkoji zona: 8,5 – 11,5 U

Neigiamas: $< 8,5 \text{ U}$

Teigiamas: $> 11,5 \text{ U}$

SEROLOGIJA

Antikūniai EBV			Infekcijos stadija
VCA IgM	VCA IgG	EBNA IgG	
-	-	-	EBV neigiamas
-	+	+	Buvusi EBV infekcija
+	+-	-	EBV infekcija ankstyvi stadija
-+	+	-+	EBV infekcija pereinamas laikotarpis
-	+	+	EBV infekcija sveikimo laikotarpis
-+	+	+	EBV infekcija reaktyvacija

SPECIALIOS TESTO CHARAKTERISTIKOS

Specifiškumas

Diagnostinis specifiškumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti neigiamą rezultatą, kai mėginyje nėra specifinio tiriamojo objekto.

Specifiškumas yra 96,3 proc.

Jautrumas

Diagnostinis jautrumas apibūdinamas tikimybe taikant metodą gauti teigiamą rezultatą, kai mėginyje yra specifinis tiriamasis objektas.

Specifiškumas yra > 93,9 proc.

Sąveika

Sąveikos su serumais, kuriuose yra hemolizavusio kraujo, lipidų ar su serumais, gautais iš geltą patiriančių individų, nestebėta, jeigu koncentracijos neviršija 10 mg/ml hemoglobino, 5 mg/ml trigliceridų ir 0.2 mg/ml bilirubino. Šie rezultatai yra gauti tiriant mėginių grupes, tačiau tai nėra garantuojamos charakteristikos.

KRYŽMINĖS REAKCIJOS

Edenovirusas	neig
CMV	neig
Echinokokas	neig
HBV	neig
Gripas A	neig
Gripas B	neig
Leptospira	neig
Picorna	neig
Q-karštinė	neig
Raudoniukė	neig
Toksoplazma	neig

VZV	neig
Lues	neig
RSV	neig

PROCEDŪROS RIBOJIMAI

1. Jeigu naudojami atitirpinti mėginiai, įsitikinkite, kad medžiaga yra visiškai homogeninta.
2. Kontroliniai serumai yra pagaminti iš natyvinio žmogaus serumo. Todėl jie gali būti drumsti, tačiau testo rezultatui tai įtakos neturi.
3. Mėginio užteršimas bakterijomis ar pakartotinis užšaldymas – atitirpinimas gali turėti įtakos absorbcijos rodikliams.
4. Infekcinės ligos diagnozės negalima nustatyti remiantis vieno testo rezultatais. Kad diagnozė būtų tiksli reikia atsižvelgti į klinikinę istoriją, simptomus bei serologinius duomenis.
5. Pacientams su nusilpusia imunine sistema ir naujagimiams serologinių duomenų vertė yra ribota.

NovaTec Immundiagnostica GmbH
Waldstrasse 23
63128 Dietzenbach
Vokietija

CE

Platintojas: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburgas
Vokietija

Novagnost, BEP ir BEP 2000 Advance registruoti *Siemens Healthcare Diagnostics* prekių ženklai.

Novagnost[®] **EBV-VCA** IgM testo procedūra

Paruoškite reagentus

Praskieskite mėginius 1+100
su IgG buferiniu tirpalu mėginiams skiesti Paruošti naudoti kontroliniai serumai

Ilašinkite 100 µl kontrolinių serumų (neigiamo,
2 mėginius ribinio, teigiamo) ir 100 µl tiriamojo mėginio (praskiesto)

BEP 2000 / BEP2000 Advance
Visiškai automatizuotas procesas

Inkubacija:
60 min. $\pm 5'$ / 37° C $\pm 1^\circ$ C

Plaukite 3 kartus

BEP III visiškai automatizuotas procesas

100 µl konjugato

Inkubacija:
30 min. $\pm 2'$ / nuo +20 iki +25° C

Plaukite 3 kartus

100 µl TMB substrato tirpalo

Inkubacija:
15 min. / nuo +20 iki +25°C (saugoti nuo šviesos)

100 µl reakciją sustabdančio tirpalo

(daugiausia po 30 min.) matavimas:
450 nm palyginant su 620 nm

Testo rezultatas