

**VIROTECH Borrelia + VlsE IgG ELISA
(Borrelia + VlsE IgG ELISA)**

Nr zamówienia: EC022G00 Kod barwny: srebrny

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Nr zamówienia: EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Nr zamówienia: EN022L65

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

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

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613
<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 25.3.2019

REV 14 / VIROTECH Borrelia + VlsE IgG ELISA PL

TreŚĆ

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. ZawartoŚĆ opakowania	3
3.1 ZawartoŚĆ opakowania IgG	3
3.2 ZawartoŚĆ opakowania (Standardy pŃny mózgowo-rdzeniowego IgG)	3
4. Przechowywanie i okres trwaŁoŚci zestawu testowego oraz gotowych do uŁycia odczynników	3
5. Środki ostroŁnoŚci i ostrzeŁenia	4
6. MateriaŁy dodatkowe, potrzebne (niezaŁĄczone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania	4
7.1 MateriaŁbadawczy	4
7.2 Przygotowanie odczynników	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania	5
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)	6
8.3 Schemat oceny IgG i IgA	6
8.4 Ograniczenia testu	6
9. Literatura	6
10. Schemat przebiegu badania	8

1. Cel zastosowania

Test ELISA Borrelia afzelli+VlsE IgG (szczep PKo) służy jako test przesiewowy (test skriningowy) do ilościowego i jakościowego oznaczenia przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato w surowicy ludzkiej. Równocześnie jest przeznaczony do ilościowego oznaczenia włośnicy dla OUN syntezy przeciwciał IgG i IgM przez badanie równoległe par surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydazy) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zawartość opakowania IgG

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 żłomkowych dołków opłaszczonych antygenami „.
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzastkowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzidyna i roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszaninę kwasów

3.2 Zawartość opakowania (Standardy płynu mózgowo-rdzeniowego IgG)

Standardy Borrelia ELISA IgG do kwantyfikacji swoistych dla czynników chorobotwórczych stężenia przeciwciał 4 buteleczki po 1000 µl, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowe do użycia, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = arbitralne jednostki pomiarowe).

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych zagęszczeń pozostają pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjść tylko potrzebne do testu ilości gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjńtego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odżywny, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrola	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytkę mikrotitracyjną	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w	3 miesiące

		dostarczonej torebce z osuszaczem)	
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako surowice kontrolne stosowane sŃtylko te surowice, które byŃy przebadane i uzyskaŃy wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieŃczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania naleŃy mimo to traktowaŃ jako materiaŃpotencjalnie zakaŃny i obchodziŃ siŃ z nimi odpowiednio ostroŃnie. ObowiŃzujŃ odpowiednie wytyczne dotyczŃce prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierajŃce Œrodki konserwujŃce, roztwŃr zatrzymujŃcy reakcjŃ na bazie cytrynianu i TMB podraŃniajŃ skŃrŃ, oczy i bŃŃny Œluzowe. W przypadku kontaktu naleŃy natychmiast przemyŃ dane miejsca ciaŃa, bieŃŃŃ wodŃ i ewentualnie pŃjŃ do lekarza.
3. Usuwanie zuŃytych materiaŃw nastŃpuje zgodnie z wytycznymi obowiŃzujŃcymi w danym kraju.

6. MateriaŃy dodatkowe, potrzebne (niezaŃczone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanaŃowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probŃwki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywka pŃtek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiaŃw zakaŃnych
8. rŃczna pŃczka ELISA lub automatyczna pŃczka mikropŃtek
9. spektrofotometr do odczytu mikropŃtek z filtrem 450/620nm (referencyjna dŃugoŃŃ fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

DokŃadne przestrzeganie przepisŃw roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidŃowych wynikŃw.

7.1 MateriaŃbadawczy

Jako materiaŃbadawczy moŃna zastosowaŃ surowicŃ i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantŃw), nawet jeŃŃi w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

RozcieŃczone próbki od pacjentŃw muszŃbyŃ zawsze ŒwieŃŃe podczas zastosowania.

W celu dŃuŃszego przechowywania surowice muszŃbyŃ zamroŃbne. NaleŃy unikaŃ wielokrotnego rozmraŃania.

1. StosowaŃ tylko ŒwieŃŃe, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosowaŃ probek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mŃtnych surowic (faŃszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynnikŃw

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duŃy stopieŃ elastycznoŃci poprzez moŃliwoŃŃ zastosowania buforu do rozcieŃczania i pŃkowania, TMB, roztworu zatrzymujŃcego reakcjŃ na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezaleŃnie od parametrŃw i serii. Gotowe do uŃycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) naleŃy stosowaŃ swoiŃŃe dla parametrŃw i wyŃŃcznie z seriiŃpŃtek podanŃw w certyfikacie kontroli jakoŃciowej.

1. UstawiŃ inkubator na temperaturŃŃ 37°C i przed rozpoczŃciem inkubacji sprawdŃiŃ , czy osiŃgniŃto danŃtemperaturŃŃ.
2. Wszystkie odczynniki doprowadŃiŃ do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyŃ opakowanie z paskami testowymi.

3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do pływania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100 µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczenia (Ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (Ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10 µl surowicy + 1 ml buforu do rozcieńczenia.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne pływanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do pływania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do pływania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłogę z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołek.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne pływanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołek dodać pipetami po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytki, a płytki całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzenia

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
 2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał
 3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu.
- Takie postępowanie gwarantuje nienagane działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do pół ilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągnięta jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off sŃ zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywne powinny znajdowaŃ siŃ w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakoŃci.

JeŃeli wymagania (wartoŃci OD, VE) nie sŃspeŃnione, naleŃy powtŃrzyŃ test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby Ńepej (450/620nm) musi byŃ odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$VE_{\text{(kontrola pozytywna)}} = \frac{OD_{\text{(kontrola pozytywna)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(surowica pacjenta)}} = \frac{OD_{\text{(surowica pacjenta)}}}{OD_{\text{(kontrola cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schemat oceny IgG i IgA

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartoŃci graniczne
> 11,0	pozytywne

1. JeŃeli zmierzone jednostki VE próbki sŃwyŃsze od zakresu granicznego, to próbki te sŃtraktowane jako pozytywne.
2. JeŃeli zmierzone jednostki VE znajdujŃsiŃ w podanym zakresie granicznym, nie wystŃpuje istotnie duŃe stŃŃenie przeciwciaŃ próbki sŃtraktowane jako wartoŃci graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakaŃenia konieczne jest oznaczenie zawartoŃci przeciwciaŃdwŃch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna byŃ zbadana bezpoŃrednio po rozpoczŃciu zakaŃenia, a druga próbka 5-10 dni pŃŃniej (surowica rekonwalescencyjna). StŃŃenie przeciwciaŃdwŃch próbek musi byŃ oznaczone równoleŃle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest moŃliwa prawidŃowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. JeŃeli zmierzone jednostki VE próbki sŃniŃsze od zakresu granicznego, w próbce nie wystŃpujŃ dajŃce siŃ zmierzyl specyficzne dla antygenŃw przeciwciaŃ. Próbkę sŃtraktowane jako negatywne.

8.4 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzglŃdniaŃ obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze bŃdŃce do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Reakcja krzyŃowa pomiŃdzy Borrelia i innymi krŃtkami moŃe prowadziŃ do faŃszywie pozytywnego wyniku. Surowice pacjentŃw z nastŃpujŃcymi zakaŃeniami mogŃreagowaŃ krzyŃowo: kiŃŃ (*Treponema pallidum*), frambezja (*Treponema pertenue*), gorŃczka powrotna (Borrelia spec.), leptospirozy (Leptospira spec.). RŃwnieŃw przypadku chorŃb wywoŃwanych przez wirus opryszczki/Herpes (CMV, HSV, Parwowirus) moŃe dojŃ do reakcji krzyŃowych (12, 13).
3. W przebiegu infekcji EBV /mononukleoz zakaŃna/ dojŃ moŃe do niespecyficznego kszaŃtowania antyciaŃAnti-Borrelia, przede wszystkim klasy IgM /12.13/.
4. Test Borrelia afzelii + VlsE IgG ELISA jest testem przesiewowym (testem skринingowym) o maksymalnej czuŃŃci diagnostycznej i bezpieczeŃstwie. W celu zabezpieczenia wyników granicznych wzglŃdnie pozytywnych naleŃy zgodnie z diagnostykŃ 2-stopniowŃ wykonaŃ test potwierdzajŃcy (Line Immuno Assay/ Western Blot).

9. Literatura

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Borelioza (choroba z Lyme) i krŃtkownica kleszczowa, Nauka 216:1317-19.
2. Steere, A.C. (1989), Borelioza, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Reakcja przeciwciaŃna trzy grupy genomowe Borrelia burgdorferi w boreliozie europejskiej, J.Infect Dis /Ńdziennik - Choroba ZakaŃnaŃ 169: 313-318.
4. Hofmann, H. (1996) Borelioza z Lyme - problemy diagnozy serologicznej, Infekcja 24, No. 6 :470-472.

5. Pfister, H.-W., Wilske, B. (1994) Borelioza z Lyme: podstawowe aspekty naukowe i kliniczne, *The Lancet* Vol. 343: 1013-1015.
6. Dressler, F. (1994) Borelioza z Lyme u dzieci i młodzieży europejskiej, *Reumatologia Kliniczna i Eksperymentalna* 12 (Dodatek 10): 49-54.
7. Hansen, K. (1993), Laboratoryjne metody diagnostyczne w boreliozie z Lyme, Elsevier Science Publishing Co., Inc.: 12.
8. Teward, F. Braun, R. (1998), Przeprowadzanie i interpretacja serologicznych testów w przypadku podejrzenia o infekcję krętek z rodzaju *Borrelia*, *Clin. Lab.* 44: 897-902.
9. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Ocena piątnastu dostępnych w handlu testów serologicznych do diagnozy boreliozy z Lyme, *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis* 18: 551-560.
10. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antygeny *Borrelia burgdorferi* rozpoznane w trakcie boreliozy. Pojawienie się nowej reakcji immunoglobuliny M i rozwój immunoglobuliny G w późnym przebiegu choroby, *J. Clin. Invest.* 78: 934-39.
11. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Odpowiedź przeciwciał w boreliozie z Lyme: ocena testów diagnostycznych, *J. Inf. Dis.* 149: 789-95.
12. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Wirus pstein-Barr i infekcje wirusa cytomegalii powodują fałszywie pozytywne wyniki w dwu-testowym protokole IgM dla wczesnej boreliozy z Lyme, *Infekcja* 27 No.3: 231.
13. Horst, H. (1997), Endemiczna borelioza wywołana przez kleszcze /choroba lyme/ u ludzi i zwierząt, 3., przepracowane wydanie, Spitta Verlag: 128-130.
14. RKI (1999), Przewodnik w chorobach infekcyjnych, borelioza lyme, *Biuletyn Epidemiologiczny*, wydanie przepracowane
15. Oschmann und Kraiczy (1998) Borelioza lyme oraz wczesnoletnie zapalenie opon mózgowych i mózgu, *Wydawnictwo UNI-MED* 48-67.
16. Wilske et al. *MiQ* 12/2000; Urban & Fischer
17. Zhang, J.-R. et al.; Zmienność antygeniczna w *Borelia* choroby z Lyme przez przypadkowe połączenie kaset sekwencyjnych w stylu VMP, *Komórka* (1997); *Cell*; 89: 275-285
18. Lawrenz, M.B. et al.; Odpowiedź ludzkich przeciwciał na białko antygeniczne odmiany WisC *Borrelia burgdorferi*; *Amerykańskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej*; Dec. 1999: 3997-4004.
19. Wang, D., Botkin, D.J. and Norris, S.J.; Charakterystyka miejsca w genie antygenicznej odmiany vls krętków boreliozy *Borelia garinii* Ip90 i *Borelia afzelii* ACAI /20003/; *Biologia Molekularna*; 47(5): 1407-1417.

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do pękania

Σ **Roztwór do pękania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

Σ **Rozcieńczenie próbki IgG w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczenia

(Roztwór do rozcieńczenia surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

