

**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



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Niemcy

Tel.: +49 6074 23698-0

Faks: +49 6074 23698-900

Adres e-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Strona internetowa: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zawartość opakowania IgG	3
3.2 Zawartość opakowania (Standardy płynu mózgowo-rdzeniowego IgG).....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania	4
7.1 Materiał badawczy.....	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 afzelii*+VlsE IgG (szczep PKo) służy jako test przesiewowy (test skriningowy) do półilościowego i jakościowego oznaczenia przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato w surowicy ludzkiej. Równocześnie jest przeznaczony do ilościowego oznaczenia właściwej 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 (peroksydaza) 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 łamiwych 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 chrzanowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzydyna – roztwór substratu (3,3',5,5'TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszanę kwasów

3.2 Zawartość opakowania (Standardy płynu mózgowo-rdzeniowego IgG)

Standardy *Borrelia* ELISA IgG do kwantyfikacji swoistych dla czynników chorobotwórczych stężeń 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 zagłębień pozostałe 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. Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Material	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące

Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
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 (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzydyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc 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 są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały 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 należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. woda destylowana/demin.
2. pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
3. mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. probówki
5. chusty z masy celulozowej
6. przykrywa płytek ELISA
7. pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
8. ręczna płuczka ELISA lub automatyczna płuczka mikropłytek
9. spektrofotometr do odczytu mikropłytek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
10. inkubator

7. Wykonanie badania

[Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.](#)

7.1 Materiał badawczy

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa **VIROTECH** feruje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoiście dla parametrów i wyłącznie z serią płytek podaną w certyfikacie kontroli jakościowej.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do płukania 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 100µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (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. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl 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 dołków dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny 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** ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** 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 nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do półilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągana 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 są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby ślepej (450/620nm) musi być 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	wartości graniczne
> 11,0	pozytywne

1. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są wyższe od zakresu granicznego, to próbki te są traktowane jako pozytywne.
2. Jeżeli zmierzone jednostki VE znajdują się w podanym zakresie granicznym, nie występuje istotnie duże stężenie przeciwciał, próbki są traktowane jako wartości graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakażenia konieczne jest oznaczenie zawartości przeciwciał dwóch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna być zbadana bezpośrednio po rozpoczęciu zakażenia, a druga próbka 5-10 dni później (surowica rekonwalescencyjna). Stężenie przeciwciał obydwóch próbek musi być oznaczone równolegle, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest możliwa prawidłowa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. Jeżeli zmierzone jednostki VE próbki są niższe od zakresu granicznego, w próbce nie występują dające się zmierzyć specyficzne dla antygenów przeciwciała. Probki są traktowane jako negatywne.

8.4 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Reakcja krzyżowa pomiędzy *Borrelia* i innymi krętkami może prowadzić do fałszywie pozytywnego wyniku. Surowice pacjentów z następującymi zakażeniami mogą reagować krzyżowo: kiła (*Treponema pallidum*), frambezia (*Treponema pertenue*), gorączka powrotna (*Borrelia spec.*), leptospirozy (*Leptospira spec.*). Również w przypadku chorób wywoływanych przez wirus opryszczki/Herpes (CMV, HSV, Parwovirus) może dojść do reakcji krzyżowych (12, 13).
3. W przebiegu infekcji EBV /mononukleozą zakaźną/ dojść może do niespecyficznego kształtowania antyciał Anti-Borrelia, przede wszystkim klasy IgM /12.13/.
4. Test *Borrelia afzelii* + VlsE IgG ELISA jest testem przesiewowym (testem skринingowym) o maksymalnej czułości diagnostycznej i bezpieczeństwie. W celu zabezpieczenia wyników granicznych względnie pozytywnych należy zgodnie z diagnostyką 2-stopniową wykonać test potwierdzający (Line Immuno Assay/ Western Blot).

9. Literatura

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Borelioza (choroba z Lyme) – krętkownica 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 przeciwciał na trzy grupy genomowe *Borrelia burgdorferi* w boreliozie europejskiej, *J.Infect Dis* /"Dziennik - Choroba Zakaźna"/ 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. Tewald, 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 piętnastu 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 fałszywe 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. *MiQ12/2000*; Urban&Fischer
17. Zhang, J-R. et al.; Zmienność antygeniczna w *Borellii* 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 antygenicznej 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 *Borellia garinii* Ip90 i *Borellia afzelli* ACAI /20003/; *Biologia Molekularna*; 47(5): 1407-1417.

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

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

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczania

(Roztwór do rozcieńczania surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

Inkubacja próbek

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i kontrole

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja koniugatu

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl koniugatu

IgG

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja substratu

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl substratu

Zatrzymanie

50 µl roztworu do zatrzymania reakcji

ostrożnie wstrząsnąć

Pomiar ekstynkcji

Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-690nm)