

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

**Obj. I' .: EC022G00 Farebné kódovanie: zlaté/I' ervené**

**Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards**

**Obj. I' .: EC022L60**

**Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set**

**Obj. I' .: EN022L65**

**POUŽÍVAŠ LEN PRE DIAGNOSTIKU 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 3 / VIROTECH Borrelia + VlsE IgG ELISA SK

# Obsah

|                                                                                                 |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Účel použitia.....</b>                                                                    | <b>3</b> |
| <b>2. Princíp testu .....</b>                                                                   | <b>3</b> |
| <b>3. Obsah balenia.....</b>                                                                    | <b>3</b> |
| 3.1 Testovacia súprava IgG .....                                                                | 3        |
| 3.2 Obsah balenia (likvorové štandardy IgG) .....                                               | 3        |
| <b>4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie.....</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia.....</b>                                             | <b>4</b> |
| <b>6. Načítanie potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky).....</b>                             | <b>4</b> |
| <b>7. Vykonanie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA .....</b>                                             | <b>4</b> |
| 7.1 Vyšetrovaný materiál .....                                                                  | 4        |
| 7.2 Príprava reagensí .....                                                                     | 4        |
| 7.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA .....                                                        | 5        |
| 7.4 Použitie procesorov ELISA .....                                                             | 5        |
| <b>8. Vyhodnotenie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA.....</b>                                           | <b>5</b> |
| 8.1 Kontrola fungovania testu .....                                                             | 5        |
| 8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE).....                                                        | 5        |
| 8.3 Schéma vyhodnotenia IgG.....                                                                | 6        |
| 8.4 Hranice testu.....                                                                          | 6        |
| <b>9. Literatúra .....</b>                                                                      | <b>6</b> |
| <b>10. Schéma priebehu testu .....</b>                                                          | <b>8</b> |

## 1. Účel použitia

ELISA *Borrelia afzelii*+VlsE IgG (kmeť PKo) slúži ako vyhodňovací (skriningový) test na semikvantitatívne a kvalitatívne stanovenie protilátok IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v ľudskom sére a zároveň je usporiadaná k tomu, aby paralelnými vyšetreniami párov likvorového séra umožnila kvantitatívne stanovenie protilátok IgG a IgM, syntetizovaných priamo v CNS..

## 2. Princíp testu

Protilátka hľadaná v ľudskom sére tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitraľnej doske imunitný komplex. Neviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení naľtlo.

## 3. Obsah balenia

### 3.1 Testovacia súprava IgG

1. **1 mikrotitraľná doska** pozostávajúca z 96 odlomiteľných jamiek, ktoré sú potiahnuté lyofilizovaným antigénom,
2. **riediaci pufer PBS (modrý, pripravený na použitie) 2 x 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
3. **premývací roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
4. **IgG negatívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravený na použitie
5. **IgG kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgG pozitívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgG konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom v pufrí Tris, pripravený na použitie
8. **Tetrametylbenzidín - roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, pripravený na použitie
9. **Zastavovací roztok citrónanu, 6 ml**, obsahuje zmes kyselín

### 3.2 Obsah balenia (likvorové štandardy IgG)

**ELISA *Borrelia* štandardy IgG** na kvantifikáciu špecifických protilátok proti pôvodcovi ochorenia, 4 fľaštičky à 1000 µl, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie, 100 wME; 25 wME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = willkürliche Meßeinheiten - ľubovoľné merné jednotky)

## 4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávajúte pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

1. Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
2. Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.
3. Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

| Materiál              | Stav                    | Skladovanie                                                           | Trvanlivosť |
|-----------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------|
| Skúšobné vzorky       | Zriedené                | +2 až +8 °C                                                           | max. 6 h    |
|                       | Nezriedené              | +2 až +8 °C                                                           | 1 týždeň    |
| Kontrolné roztoky     | po otvorení             | +2 až +8 °C                                                           | 3 mesiace   |
| Mikrotitraľná platňka | po otvorení             | +2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom) | 3 mesiace   |
| RF absorbent          | nezriedené, po otvorení | +2 až +8 °C                                                           | 3 mesiace   |
|                       | Zriedený                | +2 až +8 °C                                                           | 1 týždeň    |
| Konjugát              | po otvorení             | +2 až +8 °C                                                           | 3 mesiace   |

|                          |                                                  |                                     |           |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| Tetrametylbenzidín (TMB) | po otvorení                                      | +2 aň +8 °C (chránený pred svetlom) | 3 mesiace |
| Zastavovací roztok       | po otvorení                                      | +2 aň +8 °C                         | 3 mesiace |
| Premývací roztok         | po otvorení                                      | +2 aň +8 °C                         | 3 mesiace |
|                          | finálne zriedený roztok (pripravený na použitie) | +2 aň +25 °C                        | 4 týždne  |

## 5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako kontrolné séra sa používajú len také séra, ktoré boli testované a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli uznané za negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, kontrolné roztoky, konjugáty a mikrotitračné príhráčky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť veľkým množstvom vody a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

## 6. Potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Viackanáľová pipeta 50 µl, 100 µl
3. Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Skúmavky
5. Rúgok z buniťiny
6. Kryt platní ELISA
7. Odpadový kontajner pre infekčný materiál
8. Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitračných platní
9. Spektrofotometer pre mikrotitračné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
10. Inkubátor

## 7. Vykonanie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržiavanie pracovného predpisu firmy VIROTECH Diagnostics.

### 7.1 Vyšetrovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulancií tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia používať vždy prvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné.

1. Používajte len prvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

### 7.2 Príprava reagensí

Diagnostickej systém VIROTECH Diagnostics poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje používať triediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a farby. Kontrolné roztoky pripravené na použitie (pozitívne kontrolné séra s hodnotou odstihnutia - cut-off, negatívne kontrolné séra) sa musia používať podľa špecifických parametrov a výhradne s platňou, ktorej farba je uvedená v certifikáte kontroly kvality.

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagensy zohrejte na teplotu miestnosti, a potom otvorte balenie s testovacími príhráčkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potrasť.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentrácii tvoria kryštály, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potrasť).

### 7.3 Vykonalie testu VIROTECH ELISA

1. Pre každú predprípravu testu napipetujte po 100 µl riediaceho pufru pripraveného na použitie (slepý pokus), negatívnych, cut-off a pozitívnych kontrolných roztokov IgG, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúľ ame vždy dvojtitú sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojtitá sada naliehavo potrebná. Pracovné nariadenie sér pacientov 1 + 100, napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru.
2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubaľ ný cyklus ukonľ ite 4-násobným premývaním, priľ om zakaľdým pouľite 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáľ v jamkách, ale odstráľte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buniľ inový podklad.
4. Do vľetkých jamôk napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame pouľitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukonľ ite 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do kaľdej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame pouľitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukonľ ite napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do kaľdej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, aľ kým sa tekutiny celkom nepremieľajú a kým nie je vidieľ jednotné ľlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenľ ná vlnová dľka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpol ľtala od vľetkých ostatných extinkciľ. Fotometrické meranie sa musí uskutoľ niľ do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Pribehovú schému testu pozri na poslednej strane.

### 7.4 Pouľtie procesorov ELISA

Vľetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môľu vykonaľ pomocou procesorov ELISA. Pouľivateľ je povinný prístroj pravidelne validovaľ.

VIROTECH Diagnostics odporúľ a nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. vľ ľích opravách váľho procesora ELISA odporúľ a firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predľh výrobcu prístroja.
2. Odporúľ a sa procesor ELISA následne vyskúľaľ pomocou validaľ nej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúľanie pomocou validaľ nej súpravy by sa malo vykonaľ najmenej raz za ľtvrť roka.
3. Pri kaľdom testovacom behu sa musia splniľ kritériá pre uvoľenie do distribúcie uvedené v certifikáте kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpeľ uje bezchybnú funkciu váľho procesoru ELISA a okrem toho slúľi k zabezpeľ eniu kvality laboratória.

## 8. Vyhodnotenie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA

Kontrolné roztoky pripravené na pouľitie slúľia k semikvantitatívnemu stanoveniu ľpecifických protilátok IgG, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýľky metódou výpolľ tu vyrovnajú, ľ ľm sa dosiahne vysoká reprodukovateľosť. Pri výpolľ te VE sa pouľívajú priemerné hodnoty OD (optickej hustoty).

### 8.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byľ < 0,15.

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byľ niľšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáте kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstihnutia (cut-off) by mali byľ vyľšie, ako hodnoty OD uvedené v certifikáте kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Výpolľ ľtané VE pozitívnych kontrol by sa mali nacháďzaľ v rámci rozpätí, uvedených v certifikáте kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú poľiadavkám, musí sa test zopakovaľ.

### 8.2 Výpolľ et jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpol ľtalaľ od vľetkých extinkciľ.

VE (pozit. kontr. roztok) =  $\frac{\text{OD (pozitívny kontr. roztok)}}{\text{OD (cut-off kontr. roztoku)}} \times 10$

VE (sérum pacienta) =  $\frac{\text{OD (sérum pacienta)}}{\text{OD (cut-off kontr. roztoku)}} \times 10$

### 8.3 Schéma vyhodnotenia IgG

| Výsledok (VE) | Posúdenie      |
|---------------|----------------|
| < 9,0         | negatívne      |
| 9,0 - 11,0    | medzná hodnota |
| > 11,0        | pozitívne      |

1. Ak namerané VE vzorky ležia nad medznou oblasťou, tak sa tieto vzorky považujú za pozitívne.
2. Ak sa namerané hodnoty VE nachádzajú v rámci uvedeného medzného rozpätia, nezistila sa žiadna signifikantne vysoká koncentrácia protilátok, teda vzorky sa považujú za medzné. Pre spoľahlivý dôkaz infekcie je potrebné stanoviť obsah protilátok dvoch vzoriek séra. Jedna vzorka séra by sa mala otestovať priamo po vypuknutí infekcie, druhá vzorka o 5-10 dní neskôr (rekonvalescentné sérum). Koncentrácia protilátok oboch vzoriek sa musí určiť paralelne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť korektnú diagnózu.
3. Ak namerané hodnoty ležia pod definovaným medzným rozpätím, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné antigénovo-sPECifické protilátky. Vzorky sa považujú za negatívne.

### 8.4 Hranice testu

1. Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brať zreteľ na klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.
2. Krížová reakcia medzi boreliou a inými spirochetami môže mať za následok falošne pozitívny výsledok. Krížovo reagovať môžu séra pacientov s nasledovnými infekciami: Syfilis (*Treponema pallidum*), frambézia (*Treponema pertenue*), návratná horúčka (Borrelia sp.), leptospirózy (*Leptospira spec.*). Ku krížovým reakciám môže dôjsť aj pri herpesových ochoreniach (CMV, HSV, parvovírus) (12, 13).
3. V priebehu infekcie EBV (infekčná mononukleóza) môže dôjsť k nešpecifickej tvorbe antiboréliových protilátok, najmä triedy IgM (12, 13).
4. ELISA IgG Borrelia afzelii + VlsE je vyhodňovací (skriningový) test s maximálnou diagnostickou citlivosťou a spoľahlivosťou. Pre overenie hraníTých, resp. pozitívnych výsledkov mal by sa v súlade s princípmi dvojstupňovej diagnostiky vykonať potvrdzovací test (Line ImmunoAssay/Western Blot).

## 9. Literatúra

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick-borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
2. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Antibody responses to the three genomic groups of Borrelia burgdorferi in European Lyme Borreliosis, J. Infect. Dis. 169: 313-318.
4. Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis - Problems of Serological Diagnosis, Infection 24, No. 6 :470-472.
5. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54.
7. Hansen, K. (1993), Laboratory Diagnostic Methods in Lyme Borreliosis, Elsevier Science Publishing Co., Inc.:12.

8. Teward,F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelienerkrankung, Clin.Lab. 44: 897-902.
9. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Evaluation of Fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis, Eur.J. Microbiol.Infect.Dis 18: 551-560.
10. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78:934-39.
11. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95.
12. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231.
13. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130.
14. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
15. Oschmann und Kraiczy (1998) Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag 48-67.
16. Wilske et al. MiQ12/2000; Urban&Fischer
17. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
18. Lawrenz, M.B. et al.; Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*; American Society of Clinical Microbiology; Dec. 1999: 3997-4004.
19. Wang, D., Botkin, D.J. and Norris, S.J.; Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI (2003); Molecular Microbiology; 47(5): 1407-1417.
20. Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999

## Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

É **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

É **Vzorky IgG -ň zriedenie**  
**1:101**

napr.

10 µl séra/plazmy + 1000 µl riediaceho pufru  
(Riediaci pufer séra je pripravený na použitie)

## Vykonanie testu

