

**VIROTECH Borrelia IgM ELISA  
(Borrelia IgM ELISA)**

**L. obj.: EC022M00 Barevné označení: zlatá/světle modrá**

**Borrelia IgM Liquor/CSF Standards**

**L. obj.: EC022L80**

**POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ**

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

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



Freigabedatum: 21.3.2019

REV 14 / VIROTECH Borrelia IgM ELISA CZ

# Obsah

|                                                                                          |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Účel použití.....</b>                                                              | <b>3</b> |
| <b>2. Princip testu .....</b>                                                            | <b>3</b> |
| <b>3. Obsah.....</b>                                                                     | <b>3</b> |
| 3.1 Obsah (soupravy IgM).....                                                            | 3        |
| 3.2 Obsah (standardní roztok IgM) .....                                                  | 3        |
| <b>4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití.....</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění .....</b>                               | <b>4</b> |
| <b>6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky).....</b>                           | <b>4</b> |
| <b>7. Testování .....</b>                                                                | <b>4</b> |
| 7.1 Testovaný materiál .....                                                             | 4        |
| 7.2 Příprava reagensů .....                                                              | 4        |
| 7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....                                                  | 5        |
| 7.4 Použití analyzátorů ELISA .....                                                      | 5        |
| <b>8. Vyhodnocení testů .....</b>                                                        | <b>5</b> |
| 8.1 Kontrola funkčnosti testu .....                                                      | 5        |
| 8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE) .....                                                 | 6        |
| 8.3 Schéma vyhodnocení IgM.....                                                          | 6        |
| 8.4 Limity testu.....                                                                    | 6        |
| <b>9. Literatura .....</b>                                                               | <b>6</b> |
| <b>10. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....</b>                              | <b>8</b> |

## 1. Účel použití

Borelie afzelii IgM ELISA (kmen PKo) slouží jako orientační test (screeningový test) k semikvantitativnímu a kvalitativnímu dŕkazu protilátek IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v lidském séru a je součástí asnořhodné provést paralelním výzkumem párŕ séra a liquoru kvantitativní dŕkaz vlastních ZNS protilátkových syntéz IgG a IgM.

## 2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru tvoř s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jeŕ se po přidání zastavovacího roztoku změní na řluté.

## 3. Obsah

### 3.1 Obsah (soupravy IgM)

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **šedící puř PBS (modřý, ihned pouŕitelný) 2 x 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
3. **Promývací roztok PBS (20x koncentrovaný) 50ml**, pH 7,2, s konzervační látkou a tween 20
4. **IgM negativní kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned pouŕitelné
5. **IgM hraniční kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned pouŕitelné
6. **IgM pozitivní kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned pouŕitelné
7. **IgM konjugát (anti-lidský), 11ml**, konjugát (ovč í nebo ostrucha kšvol ará) s kšnovou peroxidázou, obsahuje FCS a konzervační látkou v Tris puřru, ihned pouŕitelné (FCS ř fetální telecí sérum)
8. **Substrátový roztok tetrametylbenzidín (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned pouŕitelné
9. **Zastavovací roztok citřát, 6ml**, obsahuje směš kyselin

### 3.2 Obsah (standardní roztok IgM)

**Standardy IgM Borrelia ELISA** ke kvantifikaci koncentrace protilátek specifických k bacilu, 4 lahvičky à 1000 μl, lidské sérum se stabilizátory proteinŕ a konzervačním prostředkem, pšpravené k pouŕití, 100 wME; 25 wME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = svévolořstanovené mŕné jednotky)

## 4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensí pšpravených k pouŕití

Soupravu skladujte pš teplotě 2 - 8°C. Doba pouŕitelnosti jednotlivých reagensí je vyznačena na pšslužném řtítku; doba pouŕitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývajících řást jednotlivých jamek/stripŕ v uzavřném sál ku se suřídlem pš teplotě 2 - 8°C. Ř inidla ihned po pouŕití uskladněte opět pš teplotě 2 - 8°C.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě  
Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jeŕ je potřeba pro dané testování. V pšpadě ře jste odebrali pšřliř velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpěť a musí být zlikvidován.

| Materiál                       | Stav                   | Skladování                                                            | Stabilita |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| zkušební vzorky                | zředěný                | +2 až +8°C                                                            | max. 6h   |
|                                | nezředěný              | +2 až +8°C                                                            | 1 řyden   |
| kontroly                       | po otevření            | +2 až +8°C                                                            | 3 mříce   |
| mikrotitrační destička         | po otevření            | +2 až +8° (skladování v souřasně dodaném sál ku s vysouřecím sál kem) | 3 mříce   |
| revmatoidní faktor - absorbent | nezředěný, po otevření | +2 až +8°C                                                            | 3 mříce   |
|                                | zředěný                | +2 až +8°C                                                            | 1 řyden   |
| konjugát                       | po otevření            | +2 až +8°C (chrařte pšed světlem)                                     | 3 mříce   |
| tetrametylbenzidín (TMB)       | po otevření            | +2 až +8°C (chrařte pšed světlem)                                     | 3 mříce   |
| zastavovací roztok             | po otevření            | +2 až +8°C                                                            | 3 mříce   |
| prací roztok                   | po otevření            | +2 až +8°C                                                            | 3 mříce   |

|  |                                   |             |         |
|--|-----------------------------------|-------------|---------|
|  | po zředití (připravený k použití) | +2 až +25°C | 4 týdny |
|--|-----------------------------------|-------------|---------|

## 5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra se používají pouze taková séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Pěsto by měly být všechny vzorky, zředité vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrální stripy považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

## 6. Další potřebný materiál (není součástí dodávky)

1. Destilovaná/demineralizovaná voda
2. Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
3. Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Zkumavky
5. Utěrky z buniťiny
6. Vířka na destiláty ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývačka ELISA mikrotitrálních destiček
9. Mikrofotometr na mikrotitrální destičky s filtrem 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm)
10. Inkubátor

## 7. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního postupu firmy VIROTECH Diagnostics.

### 7.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto případě je zmíněno pouze sérum.

Zředití pacientů používejte vždy 1:10.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Používejte pouze 1:10, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

### 7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysokou stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředití a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny barvy a parametry. Kontroly k okamžitému použití (pozitivní kontroly, cut-off kontroly, negativní kontroly) jsou specifické pro charakteristické hodnoty a používají se výhradně s barvami destiček uvedenou v certifikátu kontroly kvality.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripy můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechny řididla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracovního roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentráta tento koncentrát před zředitím nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepte).
5. Vysoký titr IgG nebo reumatoidní faktor mohou narušit specifický průkaz IgM protilátek a mohou vést k falešně pozitivním, resp. falešně negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). Při kontrolách IgM odpadá potřebná adsorpce.

### 7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100µl zkušňovacího pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraniční kontroly a pozitivní kontroly IgM, a naředěných sér pacienta. Doporučujeme použít vždy dvě jamky (slepá hodnota, kontroly a séra pacientů; hraniční kontrola je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění sér pacienta : 1+100; např 10µl sérum + 1ml zkušňovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C ( destilka se zakryje víčkem).
3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí třikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
6. Po inkubaci konjugátu následuje třísobné promytí (viz bod 3).
7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destilku opatrně a pečlivě protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně hluboko zabarven.
10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl o deseteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

### 7.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. věžích opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přezkontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přezkontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za tři roky.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

## 8. Vyhodnocení testů

Ihned použitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgM protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výkyvy podmíněné testováním jsou vyrovnávány výpočtovou metodou, čímž je dosahována vysoká reprodukovatelnost. Pro výpočet VE použijte střední hodnoty nebo OD-hodnoty.

### 8.1 Kontrola funkčnosti testu

a) Hodnoty optické density

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15

Hodnoty optické density negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické density uváděné v certifikátu o kontrole kvality, hodnoty optické hustoty pozitivních kontrol i cut off kontrol by se měly nacházet nad hodnotami optické hustoty uváděnými v Certifikátu o kontrole kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VE)

Jednotky VIROTECH (VE) cut off kontrol jsou definovány 10 VE. Výpočetné VE pozitivních kontrol by se měly pohybovat uvnitř rozmezí uváděných v certifikátu o kontrole kvality.

Pokud nejsou požadavky (hodnoty optické hustoty, VE) splněny, musí být test opakován.

## 8.2 Výpočet jednotek VIROTECH (VE)

Absorbance slepé (450/620nm) musí být od všech absorbancí odečtena.

$$\begin{aligned} \text{VE pozitivní kontrola} &= \frac{\text{OD pozitivní kontrola}}{\text{hraniční}} \times 10 \\ \text{VE vzorek} &= \frac{\text{OD vzorek}}{\text{hraniční}} \times 10 \end{aligned}$$

## 8.3 Schéma vyhodnocení IgM

| Výsledek (VE) | Posouzení        |
|---------------|------------------|
| < 9,0         | negativní        |
| 9,0 - 11,0    | hraniční hodnoty |
| > 11,0        | pozitivní        |

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uváděného rozmezí, považují se na tyto vzorky za pozitivní.
- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí v rozmezí hraničních hodnot (šedá zóna), vzorky se berou jako hraniční. Doporučuje se tyto vzorky opakovaně testovat z nového odběru.
- Pokud jsou naměřené hodnoty menší než hraničního rozmezí, nejsou ve vyšetřovaném vzorku přítomné žádné antigenspecifické protilátky. Vzorky se považují za negativní.

## 8.4 Limity testu

- Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
- Průběh imunitní odpovědi IgM je během prvních 3 týdnů po infekci variabilní (4). Podávání antibiotik pacientům v raném stadiu onemocnění může vést k potlačení imunitní odpovědi, takže nemohou být prokázány žádné specifické protilátky anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato (8).
- Křížová reakce mezi *Borrelia* a jinými spirochetami může vést k nesprávnému pozitivnímu výsledku. Séra od pacientů s následujícími infekcemi mohou vyvolávat křížovou reakci: syfilis (*Treponema pallidum*), frambézie (*Treponema pertenue*), rekurentní horečka (*Borrelia* spec.) a leptospirózy (*Leptospira* spec.). Právě tak může dojít ke křížovým reakcím u herpetických onemocnění (CMV, HSV, Parvovirus), viz (12), (13).
- Polyklonální stimulaci B-lymfocytů v průběhu infekce EBV (infekční mononukleóza) může docházet k nespecifické tvorbě antiborreliových protilátek, především protilátek třídy IgM (12, 13). Při izolovaném nálezů IgM a chybné borreliové anamnéze musí být proto diferenciální diagnózou vyloučena infekční mononukleóza.

## 9. Literatura

- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick-borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
- Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
- 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.
- Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis - Problems of Serological Diagnosis, Infection 24, No. 6 :470-472.
- Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
- Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54.
- Hansen, K. (1993), Laboratory Diagnostic Methods in Lyme Borreliosis, Elsevier Science Publishing Co., Inc.:12.
- Tewald, F., Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion (Realizace a interpretace sérologických testů při podezření na infikování boreliózou), Clin.Lab. 44: 897-902.
- 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 (Domáci klíšťová borelióza (lymská choroba) u lidí a zvířat), 3. přepracované vydání, vydavatelství Spitta: 128-130.
14. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose (Rádce k infekčním chorobám, lymská borelióza), Epidemiologický bulletin, přepracované vydání
15. Oschmann a Kraiczy (1998) Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis (Lymská borelióza a raná letní meningoencefalitida, vydavatelství UNI-MED 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 (1997); Cell; 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. Reiber H., und Lange P. (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain, Clin Chem 37: 1153-60
21. Reiber, H. und Peter J. B. (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, Journal of the Neurological Sciences 184: 101-122.

## Připrava vzorků a promývacího roztoku

É **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

É **zředění vzorky IgM**  
**1:101**

**adsorpce revmatoidního faktoru pomocí RF-SorboTech**

např.:

5 µl sérum/plazmy + 450 µl ředícího roztoku na vzorek +

1 kapka RF- SorboTech, inkubace při pokojové teplotě

po dobu 15 minut

## Schéma testu

