

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

Rendelési szám: EC022M00 Színkód: arany / világoskék

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards

Rendelési szám: EC022L80

CSAK *IN VITRO* DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA

**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 HU14

Tartalom

1. Alkalmazás célja.....	3
2. A teszt működési elve	3
3. A csomag tartalma	3
3.1 A csomag tartalma (IgM teszt készlet).....	3
3.2 A csomag tartalma (IgM CSF szabványok)	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági elírások.....	4
6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)	4
7. A vizsgálat elvégzése.....	4
7.1 Vizsgálati anyag	4
7.2 A reagensek előkészítése	4
7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése	5
7.4 ELISA-processzor alkalmazása.....	5
8. A vizsgálati eredmények kiértékelése	5
8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése	5
8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása.....	6
8.3 IgM kiértékelési táblázat.....	6
8.4 A teszt határai	6
9. Irodalom.....	6
10. A vizsgálat folyamatábrája vázlata	8

1. Alkalmazás célja

A *Borrelia afzelii* IgM ELISA (PKo törzs) anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato IgG- és IgM-antitestek humán szérumból történő szemikvantitatív és minőségi kimutatására szolgáló szűrőteszt (screening teszt), valamint alkalmas a szérum liquor párok párhuzamos vizsgálatán keresztül a központi idegrendszer saját IgG- és IgM-antitest szintézisének kvantitatív kimutatására.

2. A teszt működési elve

A humán szérumból kimutatandó antitest immunkomplexet alkot a mikrotiter lemezre rögzített antigénnel. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás eltávolítja. Az említett immunkomplexhez kötődik az enzimkonjugátum. A meg nem kötött immunglobulinokat a mosási eljárás ismét eltávolítja. A szubsztrátoldat (TMB) hozzáadása után az enzim (peroxidáz) aktivitása egy kék színyt képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színre változik.

3. A csomag tartalma

3.1 A csomag tartalma (IgM teszt készlet)

1. **1 Mikrotiter lemez**, mely 96, antigénnel bevont, egyesével letörhető lyukból (reakcióedényből) áll (líoilizált).
2. **PBS hígítópuffer (kék, felhasználásra kész) 2x50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
3. **PBS mosóoldat (20x koncentrált) 50ml**, pH 7,2, tartósítószerrel és Tween 20
4. **IgM negatív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
5. **IgM kimutató határérték (cut-off) kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
6. **IgM pozitív kontroll, 2000 µl**, humán szérum fehérje-stabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész
7. **IgM-konjugátum (anti-humán), 11ml**, (juh vagy kecske)-torma-peroxidáz konjugátum FCS-el és tartósítószerrel, Tris pufferben, felhasználásra kész
8. **Tetrametil-benzidin szubsztrátoldat (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, felhasználásra kész
9. **Citrát fixáló (stop) oldat, 6 ml**, savkeveréket tartalmaz

3.2 A csomag tartalma (IgM CSF szabványok)

Borrelia ELISA IgM-standardok a kórokozóspezifikus antitestkoncentráció mennyiségi meghatározására, 4 üvegcse egyenként 1000 µl, humán szérum fehérjestabilizátorokkal és tartósítószerrel, felhasználásra kész állapotban, 100 öME; 25 öME; 6,2 öME; 1,5 öME (öME= önkényes mérési egység).

4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága

A teszt készletet 2-8°C között kell tárolni. Az egyes komponensek eltarthatósága azok címkéjén található; a kit eltarthatósága tekintetében lásd a minőségellenőrzés tanúsítványt.

1. A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reageneket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
2. A felhasználásra kész konjugátum és a TMB oldat fényérzékeny és így ezeket sötétben kell tárolni. Ha a szubsztrátoldatot fény éri és ennek következtében elszíneződik, a továbbiakban nem használható fel. ki kell dobni.
3. Csak az elvégzendő teszthez szükséges mennyiségű felhasználásra kész konjugátumot illetve TMB-t vegye ki az üvegekből. A feleslegben kivett konjugátumot illetve TMB-t ki kell önteni, az üvegekbe azokat visszatölteni nem szabad.

Anyag	Állapot	Tárolás	Tartósság
Vizsgálati minták	Hígított	+2 és +8°C között	max. 6 óra
	Hígítatlan	+2 és +8°C között	1 hét
Kontrollok	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mikrotiterlemez	felbontás után	+2 és +8°C között (Tárolás a mellékelt tasakban szárítószerrel)	3 hónap
Reumafaktor α abszorbens	Hígítatlan, felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
	Hígított	+2 és +8°C között	1 hét
Konjugátum	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Tetrametil-benzidin (TMB)	felbontás után	+2 és +8°C között (fénytől védve)	3 hónap
Leállítóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap
Mosóoldat	felbontás után	+2 és +8°C között	3 hónap

	Véghígított (Használatra kész)	+2 és +25°C között	4 hét
--	--------------------------------	--------------------	-------

5. Óvintézkedések és biztonsági elírások

1. Kontrollszérumként csak tesztelt és HIV1-antitestekre, HIV2-antitestekre, HCV-antitestekre és Hepatitis-B felületi antigénekre negatív eredményt mutatott szérum kerül alkalmazásra. Ennek ellenére valamennyi minta, hígított minta, konjugátum és mikrotiter csík potenciálisan fertőző anyagnak tekintendő. A termékek kezelése a laboratóriumi munkára általánosan vonatkozó szabályok szerint történjen.
2. A tartósítószer tartalmazó komponensek, a citrát fixáló (stop) oldat és a TMB irritálják a bőrt, a szemet és a nyálkahártyát. Az érintett testrészt folyó vízzel azonnal le kell mosni, és szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
3. A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

1. Desztillált / ioncserélt víz
2. Nyolccsatornás pipetta, 50 µl és 100 µl
3. Mikropipetták: 10 µl, 100 µl és 1000 µl
4. Vegyszerüvegek
5. Papírkendő és itatóspapír
6. Fedő az ELISA lemezekhez
7. Hulladéktároló a fertőző anyagok számára
8. ELISA kézi- ill. automata mosó mikrotiter lemezekhez
9. Spektrofotométer ELISA lemezekhez, hullámhossz 450 nm, referencia hullámhossz: 620 nm (referenciahullám hossza 620-690nm).
10. Inkubátorszekrény

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a VIROTECH Diagnostics által elírt módszer pontos betartásával kapunk helyes eredményeket.

7.1 Vizsgálati anyag

Vizsgálati anyagként használható szérum és plazma (itt az antikoagulálás módjának nincs jelentősége), még akkor is, ha a csomagmellékletben csak szérumról van szó.

A pácienshígításokat mindig frissen kell elkészíteni.

Hosszabb tároláshoz a szérumokat le kell fagyasztani. A többszöri felolvasztást kerülni kell.

1. Csak friss, nem inaktivált szérumot szabad felhasználni.
2. Hiperlipémiás, hemolitikus és mikrobiológiailag fertőző mintákat, valamint zavaros szérumokat nem szabad felhasználni (hamis pozitív illetve negatív eredmények).

7.2 A reagensek előkészítése

A VIROTECH Diagnostics System Diagnostik nagyfokú rugalmasságot kínál azért, hogy a hígító- és mosópufferek, a TMB és a citrát fixáló (stop) oldat valamint a konjugátum különböző paraméterek mellett és eltérő gyártási tételek esetén is alkalmazhatóak. A felhasználásra kész kontrollok (pozitív kontroll, kimutatósi határérték (cut-off) kontroll, negatív kontroll) paraméterfüggetlen és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

1. Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
2. Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
3. Minden folyékony komponenst jól rázzon fel használat előtt.
4. A mosóoldat-koncentrátumot 1 l-re fel kell tölteni desztillált vagy demineralizált vízzel (ha a koncentrátumban esetleg kristályképződés látható, kérjük az oldatot hígítás előtt szobahőmérsékletre melegíteni, és használat előtt jól felrázni).
5. A specifikus IgM-antitestek kimutatását zavarhatja a túl magas IgG-titer illetve reumafaktorok jelenléte, hamis pozitív illetve negatív eredményekhez vezetve. A **szérumokat elő kell kezelni RF-SorboTech** (VIROTECH-adszorpciósszer) készítménnyel. IgM kontrollok esetében az előabszorpció lépés kimarad.

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

1. Pipettázzon ki tesztenként 100 µl felhasználásra kész hígítópuffert (vak minta), negatív, határérték (cut-off) és pozitív IgM kontrollt, valamint a hígított betegszérumokat. Minden esetben (vak, kontrollok, betegszérumok) javasoljuk hogy két párhuzamos mérést végezzen; a határérték (cut-off) kontrollok esetében a két mérés elvégzése feltétlenül szükséges. Munkahígítás betegszérumok esetében: 1+100; pl. 10 µl szérum + 1 ml hígítópuffer.
2. A reagensok kipipetázása után 30 perc 37°C-on történő inkubáció következik (fedő alatt).
3. Az inkubációs idő lejártá után mossa ki a lyukakat 4-szer 350-400 µl mosóoldattal (lyukanként). Mosóoldatot ne hagyja a lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipettázzon 100 µl felhasználásra kész konjugátumot.
5. Inkubálja a konjugátumot 30 percig 37°C-on (fedő alatt).
6. A konjugátum inkubálását 4-szeri mosással állítsa le. (ld. 3. pont).
7. Pipettázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipettázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítja a szubsztrátreakciót. Óvatosan kevertesse a lemezt, amíg a folyadékok teljesen összekeverednek és egy egységes sárga szín láthatóvá válik.
10. Mérjen extinkciót 450/620 nm-en (referenciahullám hossza 620-690nm). Állítsa úgy be a fotométert, hogy a mért vak érték a többi extinkciós értékből levonásra kerüljön (nullázza a fotométert az üres értékre). A fotometriás mérést a fixáló (stop) oldat hozzáadása után egy órán belül el kell végezni.

A vizsgálat folyamatábráját ld. az utolsó oldalon

7.4 ELISA-processzor alkalmazása

Valamennyi VIROTECH Diagnostics ELISA termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a módszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A VIROTECH Diagnostics a következő eljárást javasolja:

1. Az ELISA processzor üzembehelyezése ill. nagyobb javítása esetén javasoljuk, hogy végeztesse el a készülék hitelesítését a gyártó előírásai szerint.
2. Javasoljuk, hogy az ELISA processzort ellenőrizze a hitelesítő kit (EC250.00) segítségével is. A hitelesítő kittel történő ellenőrzést legalább negyedévenként ajánlott elvégezni.
3. Minden mérési sorozat során meg kell felelni a termék minőségi tanúsítványában szereplő minőségellenőrzési kritériumoknak.

Ez az eljárás mód biztosítja az ELISA processzor kifogástalan működését, és ezen túl a labor minőségbiztosítását is szolgálja.

8. A vizsgálati eredmények kiértékelése

A felhasználásra kész kontrollok a specifikus IgM-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitatív meghatározására szolgálnak. A teszt végrehajtása során előforduló ingadozásokat a számítási módszer kiegyenlíti, ezáltal nagyfokú reprodukálhatóságot érve el. A VE kiszámításához az OD-értékek átlagát kell használni.

8.1 A teszt helyes működésének ellenőrzése

a) OD-értékek

Az üres minta OD-értéke <0,15 kell, hogy legyen.

A negatív kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek alatt, míg a pozitív kontrollok és a cut-off kontrollok OD-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott OD-értékek felett kell lenniük.

b) VIROTECH egységek (VE)

A cut-off kontrollok VIROTECH egységekben (VE) megadott értéke 10 VE-ben van meghatározva. A pozitív kontrollok VE-értékeinek a minőségi tanúsítványban megadott értéktartományon belül kell lenniük.

Amennyiben a fenti feltételek (OD-értékek, VE értékek) nem teljesülnek, a tesztet meg kell ismételni.

8.2 A VIROTECH egységek (VE) számítása

A vak minta extinkcióját (450/620 nm) minden extinkcióból ki kell vonni.

$$\begin{aligned} \text{VE}_{(\text{pozitív kontroll})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{pozitív kontroll})}}{\text{OD}_{(\text{cut-off kontroll})}} \times 10 \\ \text{VE}_{(\text{betegszérum})} &= \frac{\text{OD}_{(\text{betegszérum})}}{\text{OD}_{(\text{cut-off kontroll})}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 IgM kiértékelési táblázat

Eredmény (VE)	Kiértékelés
< 9,0	negatív
9,0 - 11,0	határérték
> 11,0	pozitív

1. Amennyiben a minta mért VE értéke a határérték felett van, a mintát pozitívnak kell tekinteni.
2. Ha a mért VE értékek a megadott határérték tartományba esnek, az antitestek koncentrációja nem számottevő és a mintát határértéken levőnek kell tekinteni.
3. Ha a mért értékek a meghatározott határérték alá esnek, a mintából nem mutatható ki antigénspecifikus antitest. A mintát negatívnak kell tekinteni.

8.4 A teszt határai

1. A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
2. Az IgM-immunválasz lefutása az első 3 hét során változó (4). A betegek antibiotikumkezelése a betegség korai stádiumában elnyomhatja az immunválaszt, és ebben az esetben nem lehet anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato specifikus antitestet kimutatni (8).
3. A *Borrelia* és egyéb *Spirochaeták* közötti keresztreakció hamis pozitív eredményhez vezethet. Az alábbi fertőzésekben szenvedő betegek szérumai adhatnak keresztreakciót: Szifilisz (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenue*), febris recurrens (epidémias visszatérő láz) (*Borrelia* fajok), leptospirozis (*Leptospira* fajok). Hasonlóképpen herpeszfertőzések (CMV, HSV, *Parvovirus*) esetében is előfordulhat keresztreakció (12, 13).
4. EBV (fertőző mononukleózis) fertőzés során a B-limfociták poliklonális stimulációja anti-*Borrelia*-antitestek nem specifikus képződéséhez vezethet, mindenekelőtt az IgM osztályban (12,13). Izolált IgM lelet és *Borrelia* anamnézis hiánya esetén ezért differenciáldiagnosztikával kell kizárni a fertőző mononukleózis lehetőségét.

9. Irodalom

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. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion, 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 (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.

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

É **Mosóoldat:** A koncentrátumot hígítsa fel 1 literre desztillált vagy ioncserélt vízzel.

É **IgM-minták - hígítás**

1:101

Reumafaktor-abszorpció RF-SorboTech-hel

pl.:

5 µl szérum/plazma + 450 µl hígítópuffer +

1 csepp RF-SorboTech, 15 perc inkubáció szobahőmérsékleten

A vizsgálat elvégzése

