

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

N° articolo: EC022M00 Codice colore: oro/celeste

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards

N° articolo: EC022L80

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

**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 IT

Indice

1. Finalità d'uso	3
2. Principio del test	3
3. Contenuto della confezione	3
3.1 Contenuto della confezione (kit per test IgM)	3
3.2 Contenuto della confezione (set IgM liquor)	3
4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso	3
5. Precauzioni e avvertenze	4
6. Altro materiale occorrente (non fornito).....	4
7. Esecuzione del test	4
7.1 Materiale di analisi	4
7.2 Preparazione dei reattivi	4
7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA	5
7.4 Impiego di strumenti ELISA	5
8. Valutazione del test	5
8.1 Controlli funzionali del test:	5
8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE)	6
8.3 Schema di valutazione delle IgM	6
8.4 Limiti del test	6
9. Bibliografia	6
10. Schema di svolgimento del test	8

1. Finalità d'uso

Il test ELISA IgM per *Borrelia afzelii* (ceppo PKo) serve da test di screening per la determinazione semiquantitativa e qualitativa degli anticorpi anti-IgG contro *Borrelia burgdorferi* sensu lato nel siero umano ed è contemporaneamente adeguato per eseguire la determinazione quantitativa di sintesi degli anticorpi anti-IgG e anti-IgM specifici del SNC mediante analisi parallela di appaiamenti di siero-liquor.

2. Principio del test

L'anticorpo ricercato nel siero umano forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

3. Contenuto della confezione

3.1 Contenuto della confezione (kit per test IgM)

1. **1 micropiastra**, composta da 96 pozzetti singoli in strip frazionabili, rivestiti con antigene, liofilizzato
2. **soluzione salina tamponata PBS per diluizione (blu, pronta per l'uso), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
3. **soluzione PBS per lavaggio (concentrata 20 volte) 50ml**, pH 7,2, con conservante e Tween 20
4. **controllo IgM negativo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
5. **controllo IgM cut-off, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
6. **controllo IgM positivo, 2000µl**, siero umano con stabilizzante proteico e conservante, pronti per l'uso
7. **coniugato IgM (anti-umano), 11ml**, coniugato con perossidasi di rafano (capra o pecora) con FCS e conservante in tampone Tris, pronto per l'uso
8. **soluzione per substrato di tetrametilbenzidina (3,3',5,5'TMB), 11ml**, pronta per l'uso
9. **soluzione bloccante al citrato, 6ml**, contiene una miscela di acidi

3.2 Contenuto della confezione (set IgM liquor)

Standard IgM ELISA per *Borrelia* per la quantificazione di concentrazioni di anticorpi specifici all'agente patogeno, 4 flaconcini da 1000 µl, siero umano con stabilizzatori proteici e conservanti, pronto per l'uso, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = unità di misura arbitraria)

4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.
2. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
3. Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana
Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi

Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

5. Precauzioni e avvertenze

1. Sono impiegati come sieri di controllo esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e verso l'antigene di superficie dell'epatite B. Tuttavia i campioni, i campioni diluiti, i controlli, i coniugati e le strisce per microtitolazione devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione bloccante al citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

6. Altro materiale occorrente (non fornito)

1. Acqua distillata/demineralizzata
2. Pipetta a 8 canali 50µl, 100µl
3. Micropipette: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Provette per i campioni
5. Salviette di carta o carta assorbente
6. Pellicola protettiva per piastre ELISA
7. Contenitore per rifiuti infetti
8. Lavatore a mano ELISA o lavatore automatico per micropiastre
9. Spettrofotometro per micropiastre con filtro 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)
10. Incubatore

7. Esecuzione del test

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da VIROTECH Diagnostics è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

7.1 Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

Preparare le diluzioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

1. Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.
2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

7.2 Preparazione dei reattivi

La VIROTECH Diagnostics System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. I controlli pronti per l'uso (controlli positivi, controlli cut-off, controlli negativi) sono specifici dei parametri e da impiegare esclusivamente con le piastre indicate dal certificato del controllo qualità.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.

4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).
5. Un titolo elevato di IgG o fattori reumatici possono interferire con l'individuazione specifica di anticorpi IgM e dare origine a risultati falsamente positivi o falsamente negativi. **Trattare preventivamente i sieri con RF-SorboTech** (materiale adsorbente VIROTECH). Per i controlli IgM si può omettere l'assorbimento preventivo.

7.3 Esecuzione del test VIROTECH ELISA

1. Per ogni serie di test dispensare 100µl del tampone diluente pronto per l'uso (valore bianco), dei controlli negativi, cut-off, del controllo positivo IgM e dei sieri diluiti dei pazienti. Raccomandiamo sempre una doppia serie (bianco, controlli e sieri pazienti); per i controlli cut-off la doppia serie è obbligatoria. Diluizione operativa dei sieri dei pazienti: 1+100; per es. 10µl di siero + 1ml di tampone diluente.
2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

7.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA VIROTECH Diagnostics possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, VIROTECH Diagnostics raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

8. Valutazione del test

I controlli pronti per l'uso servono ad una determinazione semiquantitativa di specifici anticorpi IgM, la cui concentrazione è indicata in unità VIROTECH (= VE). Le variazioni causate dall'esecuzione del test sono compensate dal metodo di calcolo, ottenendo quindi un'elevata riproducibilità. Per il calcolo delle VE si utilizzano i valori DO medi.

8.1 Controlli funzionali del test:

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15

I valori DO dei controlli negativi dovrebbero essere inferiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità, i valori DO dei controlli positivi e dei controlli cut-off dovrebbero essere superiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità.

b) Unità VIROTECH (VE)

Le unità VIROTECH (VE) dei controlli cut-off sono definite pari a 10 VE. Le unità VE calcolate dei controlli positivi devono rientrare nei range indicati dal certificato di controllo qualità.

Se tali requisiti (valori DO, VE) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

8.2 Calcolo delle unità VIROTECH (VE)

L'estinzione del valore bianco (450/620nm) deve essere sottratta da tutte le estinzioni.

$$VE_{\text{(controlli positivi)}} = \frac{DO_{\text{(controlli positivi)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(siero paziente)}} = \frac{DO_{\text{(siero paziente)}}}{DO_{\text{(controlli cut - off)}}} \times 10$$

8.3 Schema di valutazione delle IgM

Risultato (VE)	Valutazione
< 9,0	negativo
9,0 - 11,0	al limite
> 11,0	positivo

1. Se le VE misurate del campione sono superiori alla zona limite, i campioni sono considerati positivi.
2. Se le VE misurate si trovano nella zona limite, ma in assenza di concentrazioni significative di anticorpi, i campioni sono considerati al limite. Per accertare con sicurezza la presenza di un'infezione, è necessario determinare il livello di anticorpi di due campioni di siero. Uno dei campioni deve essere testato subito dopo l'inizio dell'infezione, un secondo campione dopo 5-10 giorni (siero convalescente). La concentrazione di anticorpi dei due campioni deve essere determinata in parallelo, cioè nella stessa serie di test. Non è possibile ottenere una diagnosi corretta sulla base della valutazione di un singolo campione.
3. Se i valori misurati sono al di sotto della zona limite definita, il campione non contiene anticorpi specifici dell'antigene in misura rilevabile. I campioni sono quindi considerati negativi.

8.4 Limiti del test

1. L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.
2. La curva della risposta immunitaria IgM è variabile nelle prime 3 settimane dopo l'infezione (4). Il trattamento dei pazienti con antibiotici nel primo stadio della malattia può determinare una soppressione della risposta immunitaria che rende impossibile rilevare gli anticorpi specifici alla *Borrelia burgdorferi* s.l. (8).
3. La reazione crociata tra la *Borrelia* e altre spirochete può avere come conseguenza un falso risultato positivo. Possono dare reazioni crociate i pazienti con le seguenti infezioni: sifilide (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenue*), febbre ricorrente (*Borrelia spec.*), leptospirosi (*Leptospire spec.*). Possono aversi reazioni crociate anche nelle malattie erpetiche (CMV, HSV, Parvovirus) (12, 13).
4. A causa di una stimolazione policlonale dei linfociti B nel corso di un'infezione EBV (mononucleosi infettiva), possono formarsi anticorpi anti-*Borrelia* aspecifici, soprattutto della classe IgM (12, 13). Quindi, in presenza di un riscontro isolato di IgM e di mancanza di anamnesi per *Borrelie*, si deve escludere una mononucleosi infettiva in diagnosi differenziale.

9. Bibliografia

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., edizione rielaborata, Casa editrice Spitta: 128-130.
14. RKI (1999), *Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose*, *Epidemiologisches Bulletin*, edizione rielaborata
15. Oschmann und Kraiczy (1998) *Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis*, Casa editrice UNI-MED 48-67.
16. Wilske et al. *MiQ*12/2000; 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; Dic.* 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.

Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

Soluzione di lavaggio: diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro.

**Campioni di IgM È diluizione
1:101**

assorbimento fattore reumatico con RF-SorboTech

per es.:

5 µl di siero/plasma + 450 µl di tampone per diluizione + 1 goccia die RF-SorboTech per RT
, incubare per 15 min

Esecuzione del test

Preincubazione	30 minuti a 37°C	100 µl campioni pazienti Bianco (tampone per diluizione) e controlli
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione coniugato	30 minuti a 37°C	100 µl coniugato IgM
↓		
Lavare 4 volte		400 µl soluzione lavaggio sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione substrato	30 minuti a 37°C	100 µl substrato
↓		
Bloccaggio		50 µl soluzione bloccante agitare con cautela
↓		
Misurare estinzione		Fotometro a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)