

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

Obj. | .: EC022M00 Farebné kódovanie: zlaté/svetlomodré

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards

Obj. | .: EC022L80

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: 21.3.2019

REV 4 / VIROTECH Borrelia IgM ELISA SK

Obsah

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

1. Účel použitia

ELISA IgG *Borrelia afzelii*+VlsE (kmeľ PKo) slúži ako vyšetřovací (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 vyšetřeniami 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. Neneviazané imunoglobulíny sa odstránia opakovaným premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neneviazané 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 na žlté.

3. Obsah balenia

3.1 Testovacia súprava IgM

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. **premyvacia roztok PBS (koncentrovaný 20 x) 50 ml**, pH 7,2, s konzervačným prostriedkom a Tween 20
4. **IgM negatívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
5. **IgM kontrolné sérum s hodnotou odstrihnutia (cut-off), 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
6. **IgM pozitívne kontrolné sérum, 2000 µl**, ľudské sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie
7. **IgM konjugát (antihumánny), 11 ml**, (ovčie alebo kozie) - konjugát chrenovej peroxidázy s FCS (fetálnym teľacím sérom) a konzervačným prostriedkom v Tris pufrí, 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

3.1 Obsah balenia (likvorové štandardy IgM)

ELISA IgG *Borrelia* štandardy na kvantifikáciu koncentrácie 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 Maßeinheiten - ľubovoľné merné jednotky)

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

Testovaciu súpravu uchovávajte 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 pohlcovačom 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 vo 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 platňa	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 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

- 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 mikrotitraľné príručky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatrnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce.
- 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 úcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
- Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6. Ďalší potrebný materiál (netvorí súčasť dodávky)

- Destilovaná/demineralizovaná voda
- Viacnásobná pipeta 50 µl, 100 µl
- Mikropipety: 10 µl, 100 µl, 1000 µl
- Skúmavky
- Rúgok z buniťiny
- Kryt platní ELISA
- Odpadový kontajner pre infekčný materiál
- Umývačka rúk ELISA a automatická premývačka mikrotitraľných platní
- Spektrofotometer pre mikrotitraľné platne so 450/620 nm filtrom (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)
- Inkubátor

7. Vykonanie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie 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 iba prvé.

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

- Používajte len iba prvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
- 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 sriediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a garáží. 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 garáža je uvedená v certifikáte kontroly kvality.

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

5. Vysoké IgG titre alebo reumatické faktory môžu rušiť špecifický dôkaz protilátok IgM a viesť k nesprávne pozitívnym alebo negatívnym výsledkom. **Pre správne stanovenie IgM je preto nutné séra vopred ošetriť prípravkom RF SorboTech** (adsorbčný prostriedok firmy VIROTECH). Pri kontrolných sérach IgM táto predadsorpcia odpadá.

7.3 Vykonanie 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 IgM, ako aj nariadených sér pacientov. Odporúčame vždy dvojité sadu testovaných vzoriek (blank, kontrolné roztoky a séra pacientov), pri kontrolnom roztoku cut-off je dvojitá 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. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350-400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buniťinovú podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, až kým sa tekutiny celkom nepremieňajú a kým nie je vidieť jednotné žlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Priebehovú schému testu pozri na poslednej strane.

7.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky testy ELISA firmy VIROTECH Diagnostics sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používajte povinný prístroj pravidelne validovať.

VIROTECH Diagnostics odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. v jeho opravách váhového procesora ELISA odporúča firma VIROTECH Diagnostics validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúvanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štyri roky.
3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečí uje bezchybnú funkciu váhového procesora ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

8. Vyhodnotenie testu DIAGNOSTIKA ZO SÉRA

Kontrolné roztoky pripravené na použitie slúžia k semikvantitatívnemu stanoveniu špecifických protilátok IgG, IgA a IgM, ktorých koncentrácia je uvedená v jednotkách VIROTECH - "VIROTECH Einheiten" (= VE). Vykonaním testu sa podmienené odchýlky metódou výpočtu vyrovnávajú, čím sa dosiahne vysoká reprodukovateľnosť. Pri výpočte VE sa používajú priemerné hodnoty OD (optickej hustoty).

8.1 Kontrola fungovania testu

a. Hodnoty OD

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

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byť nižšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by mali byť vyššie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Výpočet VE pozitívnych kontrol by sa mali nachádzať v rámci rozpätí, uvedených v certifikáte kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

8.2 Výpočet jednotiek VIROTECH (VE)

Extinkcia slepého pokusu (450/620 nm) sa musí odpočítať od všetkých extinkcií.

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

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

8.3 Schéma vyhodnotenia IgM

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

- Ak namerané VE vzorky ležia nad medznou oblasťou, tak sa tieto vzorky považujú za pozitívne.
- 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 súčasne, t. j. v rámci jednej prípravy pokusu. Na základe vyhodnotenia jednej jedinej vzorky séra nie je možné urobiť špecifickú diagnózu.
- Ak namerané hodnoty ležia pod definovaným medzným rozpätím, nenachádzajú sa vo vzorke žiadne merateľné antigénovo-špecifické protilátky. Vzorky sa považujú za negatívne.

8.4 Hranice testu

- Interpretácia serologických výsledkov by mala vždy brať do úvahy klinický obraz, epidemiologické údaje a prípadne ďalšie laboratórne nálezy, ktoré sú k dispozícii.
- Priebeh imunitnej odozvy vo forme IgM je v prvých 3 týždňoch po infekcii variabilný (4). Liečba pacienta antibiotikami v ranom štádiu ochorenia môže viesť k potlačeniu imunitnej odozvy, takže sa nedajú dokázať špecifické protilátky proti *Borrelia burgdorferi* s.l. (8).
- Krížová reakcia medzi borreliou a inými spirochetami môže mať za následok falošne pozitívny výsledok. Krížovo reagujú s sérom pacientov s nasledovnými infekciami: Syfilis (*Treponema pallidum*), frambézia (*Treponema pertenue*), návratná horúčka (*Borrelia spei*), leptospiróza (*Leptospira spec.*). Ku krížovým reakciám môže dôjsť aj pri herpesových ochoreniach (CMV, HSV, parvovírus) (12, 13).
- V priebehu infekcie EBV (infekcia mononukleóza) môže dôjsť k dôsledku polyklonálnej stimulácie B-lymfocytov k nespecifickej tvorbe antiboréliových protilátok, najmä triedy IgM (12, 13). Preto je nutné pri izolovanom náleze IgM a pri absencii boréliovej anamnézy diferenciálne diagnostickým vyšetrením vylúčiť infekciu mononukleózou.

9. Literatúra

- 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.

4. Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis in 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. Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999
21. 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
22. 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.

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

Σ **Premývací roztok:** Koncentrát doplníŠna 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

Σ **Zriedenie vzoriek**
1:101

Adsorpcia reumatoidného faktora pomocou prípravku RF-SorboTech

napr.

5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +

1 kvapka prípravku RF-SorboTech inkubovaŠ15 min pri teplote miestnosti.

Vykonanie testu

