

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

Nr zamówienia: EC024G00 Kod barwny: kolor żółty / kolor czerwony

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Nr zamówienia: EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Nr zamówienia: EN022L65

TYLKO DO DIAGNOSTYKI 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 10 / VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA PL

Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania	3
3.1 Zawartość opakowania IgG	3
3.2 Zawartość opakowania (Standardy pęnu mózgowo-rdzeniowego IgG)	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Wykonanie badania	4
7.1 Materiał badawczy	4
7.2 Przygotowanie odczynników	4
7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	5
7.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
8. Ocena wyników badania	5
8.1 Kontrola badania	5
8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)	6
8.3 Schemat oceny IgG i IgA	6
8.4 Ograniczenia testu	6
9. Literatura	6
10. Schemat przebiegu badania	8

1. Cel zastosowania

Test ELISA B. afzelii+VlsE IgG Europe (szczep PKo) służy jako test przesiewowy (test skriningowy) do ilościowego i jakościowego oznaczenia przeciwciał IgG skierowanych przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato w surowicy ludzkiej. Równocześnie jest przeznaczony do ilościowego oznaczenia włośnicy dla OUN syntezy przeciwciał IgG i IgM przez badanie równoległe par surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego.

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikropłytkę antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zawartość opakowania IgG

1. **1 mikropłytkę**, składającą się z 96 kamerych dołek opłaszczonych antygenami „ „
2. **bufor do rozcieńczania PBS (niebieski, gotowy do użycia) 2x50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
3. **roztwór do płukania PBS (20x stężony) 50 ml**, pH 7,2, zawierający środki konserwujące i Tween 20
4. **IgG kontrola negatywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
5. **IgG kontrola cut-off, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
6. **IgG kontrola pozytywna, 2000µl**, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowa do użycia
7. **koniugat IgG (anty-human), 11 ml**, koniugat (owczej lub koza) peroksydazy chrzastkowej ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi i w buforze Tris, gotowy do użycia
8. **tetrametylobenzidyna i roztwór substratu (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gotowy do użycia
9. **roztwór zatrzymujący reakcje na bazie cytrynianu, 6 ml**, zawiera mieszaninę kwasów

3.2 Zawartość opakowania (Standardy płynu mózgowo-rdzeniowego IgG)

Standardy *Borrelia* ELISA IgG do kwantyfikacji swoistych dla czynników chorobotwórczych stężenia przeciwciał 4 buteleczki po 1000 µl, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowe do użycia, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = arbitralne jednostki pomiarowe).

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych zagrożeń pozostają pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjść tylko potrzebny do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące

Płytki mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące
Absorbent czynnika reumatoidalnego	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzzydina (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do pływania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

- Jako surowice kontrolne stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
- Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciepłą bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
- Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Materiały dodatkowe, potrzebne (niezałączone w zestawie)

- woda destylowana/demin.
- pipety wielokanałowe 50µl, 100µl
- mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
- próbówki
- chusty z masy celulozowej
- przykrywka płytek ELISA
- pojemnik do usuwania materiałów zakaźnych
- ręczna płytka ELISA lub automatyczna płytka mikropłatek
- spektrofotometr do odczytu mikropłatek z filtrem 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm)
- inkubator

7. Wykonanie badania

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

7.1 Materiał badawczy

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

- Stosować tylko świeże, niedeaktywowane surowice.
- Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz młodych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

7.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa VIROTECH Diagnostics oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i pływania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii. Gotowe do użycia kontrole (kontrola pozytywna, kontrola cut-off, kontrola negatywna) należy stosować swoje dla parametrów i wyników z serii płytek podanej w certyfikacie kontroli jako ściągowej.

- Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.

2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.
4. Koncentrat roztworu do pipetowania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).

7.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

1. Na jedną próbę odpipetować po 100 µl gotowego do użycia buforu do rozcieńczania (Ślepa próba), kontroli negatywnej, kontroli cut-off i pozytywnej kontroli IgG oraz rozcieńczonych surowic pacjentów. Zalecamy za każdym razem podwójne oznaczenie (Ślepa próba, kontrole i surowice pacjentów), w kontroli cut-off podwójne oznaczenie jest obowiązkowo konieczne. Rozcieńczenie robocze surowic pacjentów: 1+100; np. 10 µl surowicy + 1 ml buforu do rozcieńczania.
2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne pipetowanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do pipetowania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do pipetowania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podkładzie z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołków.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne pipetowanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100 µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołków dodać pipetami po 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, a uzyskany całkowicie siłowymieszać i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

7.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy VIROTECH Diagnostics ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzenia.

VIROTECH Diagnostics zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma VIROTECH Diagnostics zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
 2. Zaleca się również sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
 3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu.
- Takie postępowanie gwarantuje nienagane działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

8. Ocena wyników badania

Gotowe do użycia kontrole służą do pół ilościowego oznakowania specyficznych przeciwciał IgG, których stężenie jest podawane w Jednostkach VIROTECH (=VE). Odchylenia uwarunkowane przeprowadzeniem badania są wyrównywane metodą obliczeniową i dzięki temu osiągnięta jest duża odtwarzalność. W celu obliczenia VE stosowane są średnie wartości OD.

8.1 Kontrola badania

a) wartości OD (gęstości optycznej)

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić <0,15.

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off sŃzdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywne powinny znajdowaŃ siŃ w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakoŃci.

JeŃli wymagania (wartoŃci OD, VE) nie sŃspeŃnione, naleŃy powtŃrzyŃ test.

8.2 Obliczenie Jednostek VIROTECH (VE)

Ekstynkcja próby Ńlepej (450/620nm) musi byŃ odliczona od wszystkich ekstynkcji.

$$\begin{aligned} \text{VE (kontrola pozytywna)} &= \frac{\text{OD (kontrola pozytywna)}}{\text{OD (kontrola cut - off)}} \times 10 \\ \text{VE (surowica pacjenta)} &= \frac{\text{OD (surowica pacjenta)}}{\text{OD (kontrola cut - off)}} \times 10 \end{aligned}$$

8.3 Schemat oceny IgG i IgA

Wynik (VE)	Ocena
< 9,0	negatywne
9,0 - 11,0	wartoŃci graniczne
> 11,0	pozytywne

1. JeŃli zmierzone jednostki VE próbki sŃwyŃsze od zakresu granicznego, to próbki te sŃtraktowane jako pozytywne.
2. JeŃli zmierzone jednostki VE znajdujŃ siŃ w podanym zakresie granicznym, nie wystŃpuje istotnie duŃe stŃŃenie przeciwciaŃ próbki sŃtraktowane jako wartoŃci graniczne. W celu pewnego stwierdzenia zakaŃenia konieczne jest oznaczenie zawartoŃci przeciwciaŃdwŃch próbek surowicy. Pierwsza próbka surowicy powinna byŃ zbadana bezpoŃrednio po rozpoczŃciu zakaŃenia, a druga próbka 5-10 dni pŃŃniej (surowica rekonwalescencyjna). StŃŃenie przeciwciaŃobdwŃch próbek musi byŃ oznaczone równoległe, to znaczy w jednym badaniu. Nie jest moŃliwa prawdziwa diagnoza na podstawie oceny pojedynczej próbki surowicy.
3. JeŃli zmierzone jednostki VE próbki sŃniŃsze od zakresu granicznego, w próbce nie wystŃpujŃ dajŃce siŃ zmierzyl specyficzne dla antygenŃw przeciwciaŃa. Próbkę sŃtraktowane jako negatywne.

8.4 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzglŃdniaŃ obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze bŃdŃce do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. Reakcja krzyŃowa pomiŃdzy Borrelia i innymi krŃtkami moŃe prowadziŃ do faŃszywie pozytywnego wyniku. Surowice pacjentŃw z nastŃpujŃcymi zakaŃeniami mogŃreagowaŃ krzyŃowo: kŃga (*Treponema pallidum*), frambezia (*Treponema pertenue*), gorŃczka powrotna (*Borrelia spec.*), leptospirozy (*Leptospira spec.*). RŃwnieŃw przypadku chorŃb wywoŃwanych przez wirus opryszczki/Herpes (CMV, HSV, Parwovirus) moŃe doŃŃ do reakcji krzyŃowych (12, 13).
3. W przebiegu infekcji EBV /mononukleoz zakaŃna/ doŃŃ moŃe do niespecyficznego ksztŃdowania antyciaŃAnti-Borrelia, przede wszystkim klasy IgM /12.13/.

9. Literatura

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 Ń 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 Borrelieninfektion, 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
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.

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do pękania

É **Roztwór do pękania:** Koncentrat dopełnij do 1 litra wodą destylowaną/demin.

É **Rozcieńczenie próbki IgG w stosunku 1:101**

np.:

10 µl surowicy/osocza + 1000 µl buforu do rozcieńczenia

(Roztwór do rozcieńczenia surowicy jest gotowy do użycia)

Wykonanie badania

