

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

Ł. obj.: EC024G00 Barevné označení: zlatá/ı ervená

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Ł. obj.: EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Ł. obj.: EN022L65

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽÍ

**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 CZ

Obsah

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

1. Účel použití

B. afzelii+VlsE IgG Europe 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 vhodné provést paralelním výzkumem párŕ séra a likvoru kvantitativní dŕkaz vlastních ZNS protilátkových syntéz IgG a IgM.

2. Princip testu

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

3. Obsah

3.1 Obsah (Testovací souprava IgG)

1. **1 mikrotitrační destička**, skládající se z 96 jednotlivých oddělitelných jamek potažených antigenem, lyofilizované
2. **ŕedící pufr PBS (modrý, ihned použitelný) 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. **IgG negativní kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
5. **IgG hraniční kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
6. **IgG pozitivní kontrola, 2000μl**, lidské sérum s proteinovými stabilizátory a konzervační látkou, ihned použitelné
7. **IgG konjugát (anti-human), 11ml**, (ovč í nebo ostrucha kšvol ará)-kšen-peroxidáza-konjugát s proteinovými stabilizátory a konzervačním prostředkem v THAM, pŕpravený k použití
8. **Substrátový roztok tetrametylbenzidin (3,3',5,5'TMB), 11ml**, ihned použitelné
9. **Zastavovací roztok citrát, 6ml**, obsahuje směs kyselin

3.2 Obsah (standardní roztok IgG)

Standardy IgG Borrelia ELISA ke kvantifikaci koncentrace protilátek specifických k bacilu, 4 lahví ky à 1000 μl, lidské sérum se stabilizátory proteinŕ a konzervačním prostředkem, pŕpravené k použití, 100 wME; 25 wME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = svévolně stanovené mlŕné jednotky)

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensí pŕpravených k použití

Soupravu skladujte pŕ teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensí je vyznačena na pŕslužném ŕtítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

1. Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývajících část jednotlivých jamek/stripŕ v uzavřeném sáčku se sušídlem pŕ teplotě 2 - 8°C. L. inidla ihned po použití uskladněte opět pŕ 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 pŕpadě, ŕe jste odebrali pŕliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpŕ a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zŕeděný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezŕeděný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevŕení	+2 až +8°C	3 mŕsíce
mikrotitrační destička	po otevŕení	+2 až +8° (skladování v součástí dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 mŕsíce
revmatoidní faktor - absorbent	nezŕeděný, po otevŕení	+2 až +8°C	3 mŕsíce
	zŕeděný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevŕení	+2 až +8°C (chráŕte pŕed světlem)	3 mŕsíce
tetrametylbenzidin (TMB)	po otevŕení	+2 až +8°C (chráŕte pŕed světlem)	3 mŕsíce
zastavovací roztok	po otevŕení	+2 až +8°C	3 mŕsíce
prací roztok	po otevŕení	+2 až +8°C	3 mŕsíce

	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. Přesto by měly být všechny vzorky, zředité vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripy považovány jako potenciální 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 buničiny
6. Vířáky na destiláty ELISA
7. Odpadkové koše na infekční materiál
8. Ruční nebo automatická promývací ELISA mikrotitrační destičky
9. Mikrofotometr na mikrotitrační 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 příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

Zředití pacientů používejte vždy i první.

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

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

7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysoký 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 barvící destičkou 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 i inidla 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 koncentráty tento koncentrát před zředitím nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepte).

7.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

1. Do označených jamek napipetujte 100µl zředěného pufru na vzorek (blank, slepá hodnota), negativní kontroly, hraní kontrol a pozitivní kontroly IgG, a následných sér pacienta. Doporučíme použít vždy dvě jamky (slepá

- hodnota, kontroly a séra pacientů; hranici kontroly je vždy ve dvou jamkách.. Pracovní zředění séra pacienta : 1+100; naplnit 10μl sérum + 1ml zředěovacího pufru.
- Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destilátka se zakryje víčkem).
 - Po ukončení inkubace se jamky promyjí 3x promývacím roztokem 350 - 400μl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
 - Napipetujte 100μl konjugátu do všech jamek.
 - Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
 - Po inkubaci konjugátu následuje 3x násobné promytí (viz bod 3).
 - Napipetujte 100μl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
 - Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
 - Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50μl. Destilátka opatrně a pečlivě protřepte poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
 - Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnoty byl odevzdan 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 analyzátoru ELISA

Všechny testy ELISA VIROTECH Diagnostics mohou být zpracovávány pomocí procesoru ELISA. Uživateli je povinen provést pravidelnou validaci přístroje.

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

- Při poskytnutí přístroje, resp. při opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
- V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Přezkoušení pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
- 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 testu

Okamžitelné kontroly slouží pro semikvantitativní stanovení specifických IgG protilátek, jejichž koncentrace je uváděna v jednotkách VIROTECH (=VE). Výsledky 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 hustoty

OD-hodnota slepého vzorku musí být <0,15.

Hodnoty optické hustoty negativních kontrol by měly být nižší než hodnoty optické hustoty 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. Výsledky 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 IgG

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

- Pokud se naměřené VE vzorku nacházejí nad hraničními hodnotami uvdaného 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. Pro bezpečné prokázání infekce je zapotřebí určit obsah protilátek ve dvou vzorcích séra. Jeden vzorek séra by měl být podroben testu bezprostředně po začátku infekce, druhý o 5 až 10 dní později (tzv. rekonvalescentní sérum). Koncentrace protilátek obou vzorků musí být zjišťovány paralelně, tj. v jedné testovací válce. Korektní diagnóza na základě vyhodnocení výsledku testu jediného vzorku není možná.
- 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.
- 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* sp.) a leptospirózy (*Leptospira* sp.). Právě tak může dojít ke křížovým reakcím u herpetických onemocnění (CMV, HSV, Parvovirus), viz (12), (13).
- V průběhu infekce EBV (infekční mononukleózy) může dojít k nespecifickému tvoření anti-borelióza-protilátek, především IgM (12, 13).

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, 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.

Příprava vzorků a promývacího roztoku

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

Σ **ředící Vzorky IgM**
1:101

např.:

10 µl séra/plazmy + 1000 µl ředícího roztoku na vzorek
(ředící roztok na vzorek se používá přímo)

Schéma testu

