

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

Rendelési szám: EC024G00 Színkód: arany / piros

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Rendelési szám: EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Rendelési szám: EN022L65

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI CÉLOKRA



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Németország

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail-cím: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webhely: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Tartalom

1. Alkalmazás célja	3
2. A teszt működési elve	3
3. A csomag tartalma.....	3
3.1 A csomag tartalma (IgG teszt készlet).....	3
3.2 A csomag tartalma (IgG CSF szabványok)	3
4. A teszt készlet és a felhasználásra kész reagensek tárolása és eltarthatósága	3
5. Óvintézkedések és biztonsági előírások	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	4
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.....	5
8.3 IgG kiértékelési táblázat	6
8.4 A teszt határai.....	6
9. Irodalom.....	6
10. A vizsgálat folyamatábrája vázlata.....	8

1. Alkalmazás célja

A *B. afzelii*+VlsE IgG Europe 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 színanyagot képez, mely a fixáló (stop) oldat hozzáadása után sárga színűre változik.

3. A csomag tartalma

3.1 A csomag tartalma (IgG teszt készlet)

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

3.2 A csomag tartalma (IgG CSF szabványok)

Borrelia ELISA IgG-standardok a kórokozóspezifikus antitestkoncentráció mennyiségi meghatározására, 4 üvegcsce egyenként 1000 µl, humánszérum 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.

- A szükséges lyukak felhasználása után a fennmaradó lyukakat / csíkokat zárt tasakban, 2-8°C-on, nedvszívó anyaggal együtt kell tárolni. A reagenseket használat után további tárolásra azonnal 2-8°C-ra kell tenni.
- 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.
- 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 szárítószertasakkal)	3 hónap
Reumafaktor – 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 előírások

- 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.
- A tartósítószeret 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.
- A keletkezett hulladékot az érintett ország rendelkezéseinek megfelelően kell tárolni és elhelyezni.

6. További szükséges anyagok (a csomag nem tartalmazza)

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

7. A vizsgálat elvégzése

Csak a által előírt 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.

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

7.2 A reagensek előkészítése

A **VIROTECH 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, kimutatási határérték (cut-off) kontroll, negatív kontroll) paraméterfüggetlenek és kizárólag a minőségi tanúsítványban megadott lemez charge-zsal együtt alkalmazhatók.

- Állítsa be az inkubátorszekrény hőmérsékletét 37°C-ra és az inkubáció megkezdése előtt bizonyosodjon meg róla, hogy az elérte a beállított hőmérsékletet.
- Minden reagenst engedjen felmelegedni szobahőmérsékletre; csak ezután nyissa fel a tesztcsíkokat tartalmazó csomagot.
- Minden folyékony komponens jól rázzon fel használat előtt.
- 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).

7.3 A VIROTECH ELISA vizsgálat elvégzése

- Pipetázzon ki tesztenként 100 µl felhasználásra kész hígítópuffert (vak minta), negatív, határérték (cut-off) és pozitív IgG 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 reagensek 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 hagyjon a lyukakban állni. Papírtörölközőre csepegtesse ki a maradék oldatot.
4. Minden lyukba pipetázzon 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. Pipetázzon 100 µl felhasználásra kész TMB szubsztrátoldatot minden lyukba.
8. A hordozóoldat inkubációja: 30 perc 37°C-on (lefedve, sötét helyen).
9. Minden lyukba pipetázzon 50 µl citrát fixáló (stop) oldatot, így leállítva 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 ELISA** termék alkalmas ELISA processzorokkal való használatra. A felhasználó köteles a műszer érvényesítését rendszeresen elvégeztetni.

A **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** 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 IgG-antitestek koncentrációjának VIROTECH egységekben (=VE) történő szemikvantitativ 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.

$$VE_{\text{(pozitív kontrollok)}} = \frac{OD_{\text{(pozitív kontroll)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

$$VE_{\text{(betegszérum)}} = \frac{OD_{\text{(betegszérum)}}}{OD_{\text{(cut-off kontroll)}}} \times 10$$

8.3 IgG kiértékelési táblázat

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

- Amennyiben a minta mért VE értéke a határérték felett van, a mintát pozitívnak kell tekinteni.
- Ha a mért VE értékek a megadott határérték tartományba esnek, az antitestek koncentrációja nem számottevő és a mintát határértéken levőnek kell tekinteni. A fertőzés biztos kimutatásához két szérummintából szükséges az antitestet kimutatni. Egy szérummintát közvetlenül a fertőzés kezdete után, egyet pedig 5-10 nappal később (rekonvaleszcens szérum) kell tesztelni. Az antitest-koncentrációt párhuzamosan, egyetlen teszt mérés során kell meghatározni mindkét mintából. Egyetlen szérumminta eredményei alapján korrekt diagnózis nem állítható fel.
- 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

- A szerológiai eredmények interpretációja során mindig figyelembe kell venni a klinikai összképet, az epidemiológiai adatokat valamint az esetlegesen rendelkezésre álló további laboratóriumi leleteket.
- A *Borrelia* és egyéb *Spirochaeták* közti 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).^A
- EBV (fertőző mononukleózis) fertőzés során az anti-Borrelia-antitestek nem specifikus képződése alakulhat ki, mindenekelőtt az IgM osztályban (12,13).

9. Irodalom

- 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 Borrelieninfektion, Clin.Lab. 44: 897-902.
- 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.
- 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.
- 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. *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; *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.

A betegminták és a mosóoldat előkészítése

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

▼ IgG-minták - hígítás 1:101

pl.:

10 µl szérum/plazma + 1000 µl hígítópuffer.

(a szérum hígítópuffer felhasználásra kész)

A vizsgálat elvégzése

