

BORRELIA IgM ELISA RECOMBINANT ANTIGEN

ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUALITATIVE OR QUANTITATIVE DETERMINATION OF
IgM-ANTIBODIES TO BORRELIA IN PLASMA, SERUM OR CEREBROSPINAL FLUID
CAT. NO. BI-21042 12 X 8 TESTS

ENZYMIMMUNOASSAY ZUR QUALITATIVEN ODER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
IgM -ANTIKÖRPER GEGEN BORRELIEN IN PLASMA, SERUM ODER LIQUOR
KAT. NR. BI-21042 12 X 8 TESTE

IMUNOENZYMATICKÉ KVALITATIVNÍ NEBO KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PROTILÁTEK IgM PROTI
BORRELII V PLASMĚ, SÉRU NEBO V MOZKOMÍŠNÍM MOKU.
KAT. Č. BI-21042 12 X 8 TESTŮ

IMUNOENZYMATICKÉ KVALITATIVNE ALEBO KVANTITATIVNE STANOVENIE IgM -PROTILÁTKO
PROTI BORELII V PLAZME, SÉRE ALEBO LIKVORE.
CAT. NO: BI-21042 12 X 8 VYŠETRENÍ

TEST IMMUNOENZYMATYCZNY DO JAKOŚCIOWEGO LUB ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA
PRZECIWCIAŁ KLASY IgM PRZECIWKO BORELII W OSOCZU, SUROWICY LUB PŁYNIE MÓZGOWO-
RDZENIOWYM
NR KAT. BI-21042 12 X 8 TESTÓW

ENZIM IMMUNOASSAY A BORRELIA ELLENI IgM ANTITESTEK KVALITATÍV VAGY KVANTITATÍV
MÓDSZERREL TÖRTÉNŐ MEGHATÁROZÁSÁRA SZÉRUMBÓL VAGY CEREBROSPINALIS
FOLYADÉKBÓL
CAT. NO. BI-21042 12 X 8 TESZT

rev.no. 2302020 (replacing 1901110)



Biomedica Medizinprodukte GmbH, A-1210 Wien, Divischgasse 4
Tel. +43/1/291 07 45, Fax +43/1/291 07 6389, E-mail info@bmgrp.com



CONTENT / INHALT / OBSAH / OBSAH / SPIS TREŚCI / TARTALOM

1) ENGLISH	3
2) DEUTSCH	7
3) ČESKY	11
4) SLOVENSKY.....	15
5) POLSKI	19
6) MAGYAR	23

Additional Information about our products is available on our website.

Zusätzliche Information zu unseren Produkten ist auf unserer Homepage erhältlich.

Další informace o našem sortimentu jsou na stránkách.

Doplňujúce informácie o našich výrobkoch môžete získať na našej internetovej stránke.

Dodatkowe informacje o naszych produktach są dostępne na naszej stronie internetowej.

További információ termékeinkről internetes oldalunkon található.

www.bmgrp.com

1) INTRODUCTION

Lyme borreliosis is a bacterial infection caused by the spirochaete *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Afzelii* or *Garinii*, and is characterised by a variety of clinical symptoms. It can be divided into 3 stages:

Stage 1, early dermatitis, Clinical: erythema migrans.

Stage 2, early disseminated infection, Clinical: lymphocytic meningoradiculitis (Bannwarth's syndrome), neuroborreliosis.

Stage 3, late disseminated infection, Clinical: chronic progressive encephalomyelitis, acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), chronic arthritis.

To improve the diagnostic specificity, the Biomedica microwell strips are coated with the following recombinant antigens:

- p21 = OspC (outer surface protein C): *B. afzelii* (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C): *B. garinii* (20047)
- p41/I = (inner part of flagellin): *B. bavariensis* (pBi)
- VlsE: fusion proteins of different *Borrelia* genospecies

2) CONTENTS OF THE KIT

All reagents except the wash buffer are ready for use. Store all reagents at 2-8°C.

CONT	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Microwell strips, breakable, colour coded, coated with recombinant antigen	12 x 8 strips
STD	Standards: positive (pos), cut-off (c.o.), negative (neg), ready to use	Each 1 x 1.5 ml
CONJ	Conjugate: rabbit anti human IgM HRPO, ready to use	1 x 14 ml
DIL	Sample diluent with green dye, ready to use	1 x 105 ml
SUB	Substrate: TMB substrate solution, ready to use	1 x 13 ml
WASHBUF	Wash buffer: 20x concentrated	1 x 50 ml
STOP	Stop solution: sulphuric acid, ready to use	1 x 10 ml

3) ADDITIONAL MATERIAL ADDED TO THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control sheet
- Protocol sheet
- Instruction manual for use

4) EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10-1000 µl and disposable tips
- Multichannel pipette
- ELISA reader for absorbance at 450 nm (or from 450 nm to 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results
- Plate washer is recommended for washing

5) REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

Sample preparation:

The sample can be serum or plasma (EDTA, citrate, heparin, CPD), which must be separated as soon as possible from the blood clot after blood sampling to avoid a haemolysis. CSF can also be used. Avoid microbial contamination of the samples. Insoluble substances must be removed from the sample before incubation. The use of heat-inactivated, icteric, haemolytic, lipemic or turbid samples is not recommended.

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2-8°C. Prolonged storage of the samples is possible at -25°C or below. Repeated freezing and thawing of samples is not recommended due to the risk of inaccurate results. Avoid more than 3 freeze-thaw cycles.

Sample dilution:

Dilute human serum or plasma 1:101 (1 + 100) with sample diluent, e.g. 10 µl of sample + 1 ml of sample diluent, mix well.

Dilute cerebrospinal fluid 1:2 (1 + 1) with sample diluent, e.g. 100 µl of sample + 100 µl of sample diluent, mix well.

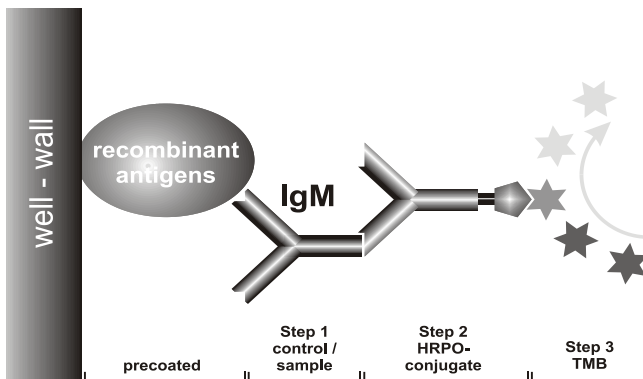
For samples with results >30 BBU/ml the samples can be diluted with sample dilution buffer and retested. Obtained results need to be multiplied with respective dilution factor for final concentration.

Conjugate: The conjugate is ready for use and should be used within 2 weeks after opening. For long term storage please aliquot and freeze at -25°C unused conjugate. Frozen aliquots are stable until expiry date stated on the original vial.

Preparation WASHBUF (Wash buffer): Dilute 20x conc. wash buffer with distilled water to 1000 ml (50 ml conc. + 950 ml dist. water). Mix well. Crystals that may appear will dissolve at room temperature. Undiluted WASHBUF is stable 2-8°C until expiry date stated on the label. The diluted wash buffer is stable at 2-8°C for one month.

STD: standards (pos, cut-off, neg) are ready to use and MUST NOT be diluted.

6) PRINCIPLE OF THE ASSAY



7) ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18-26°C) before use in the assay.

Mark position for BLANK/STD/SAMPLE/ (Blank/Standard/Sample) on the protocol sheet.

Take microtiter strips out of the alu bag, take a minimum of one well as Blank. Store unused strips with desiccant at 2-8°C in the alu bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Add 100 µl STD/SAMPLE (Standards/diluted samples) into the respective wells, except blank.
2. **Cover strips with plastic film and incubate for 1 hour at 37°C in an incubator.**
3. Aspirate and wash wells 4x with at least 250 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash.
4. Add 100 µl CONJ (anti human IgM-HRPO) into each well.
5. **Cover strips with plastic film and incubate for 30 min at room temperature (18-26°C).**
6. Aspirate and wash wells 4x with at least 250 µl diluted WASHBUF (Wash buffer). Remove remaining WASHBUF by hitting plate against paper towel after the latest wash.
7. Add 100 µl SUB (TMB substrate) into each well.
8. **Incubate 15 min at room temperature (18-26°C), in the dark.**
9. Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well. Swirl gently.
10. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

The use of an automated system is possible, but sometimes needs modifications. If you need support, please contact your local representative.

8) CALCULATION OF RESULTS

Subtract the OD of the blank from the OD's of the samples and standards.

Calculate the mean OD's of all samples and standards.

The OD of the cutoff standard represents 10 BBU/ml (Biomedica Borrelia Units). This is the basis for calculation of the results.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU / ml}$$

The quality control protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit. Data for optical density obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as data mentioned in chapter 9) ASSAY CHARACTERISTICS *part valid results* are achieved.

8.1. Qualitative calculation for serum/plasma

Positive result	samples with an OD of more than cut-off +10% (≥ 11 BBU/ml).
Borderline result	samples between 9 - 11 BBU/ml. These patients should be retested with a new sample.
Negative result	samples with an OD of less than cut-off -10% (≤ 9 BBU/ml).

8.2. Quantitative calculation for serum/plasma

Calculation of the BBU/ml is identical to the qualitative calculation, section 8.1.
 The test is linear between 5 - 30 BBU/ml. Values outside this range are semi-quantitative.
 Alternatively, samples with results >30 BBU/ml can be diluted with sample dilution buffer and retested. Obtained results need to be multiplied with respective dilution factor for final concentration.

Weak positive	Samples between 11 - 20 BBU/ml
High positive	Samples between 21 - 30 BBU/ml
Very high positive	Samples above 30 BBU/ml

8.3. Qualitative calculation for cerebrospinal fluid

The calculation of the BBU/ml is identical to the qualitative calculation, section 8.1.
 Normal values CSF: The mean of 30 CSF samples showed 1.3 BBU/ml.

Neuroborreliosis negative	Samples with values ≤ 5 BBU/ml
Suspect for Neuroborreliosis	Samples with values > 5 BBU/ml

9) ASSAY CHARACTERISTICS

Valid results:

Blank	The OD must be ≤ 0.250
Negative standard	The OD must be ≤ 0.200 (blank subtracted)
Cut-off standard	The OD must be at least twice the negative standard (blank subtracted).
Positive standard	The OD must be at least twice the OD of the cut-off standard (blank subtracted).

Crossreactivities:

	n	crossreactive
rheumafactor-positive	15	1
syphilis-positive	7	0

This ELISA uses recombinant antigens. Nevertheless, a crossreaction to autoimmune-positive samples cannot be completely excluded.

Specificity & Sensitivity:

	Serum	CSF
Sensitivity	100%	82%
Specificity	96%	91%

10) PRECISION

Intra-assay	pos (n=12)	high pos (n=12)	Inter-assay	pos (n=17)	high pos (n=20)
Mean (BBU/ml)	24	38	Mean (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
CV (%)	6.7	6.8	CV (%)	8.3	8.1

11) TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.

- Do not use reagents beyond expiration date. Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.

12) PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab, HCV-Ab and HBsAg and were found negative. Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious. Liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 950 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane. Proclin 950 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions, avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where reagents are used.
- Avoid all contact with the reagents by using gloves.
- Sulfuric acid is irritating to eyes and skin. Flush with water if contact occurs. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. - Flush with water after contact!

13) LITERATURE

- "Use of Recombinant Antigens of *Borrelia burgdorferi* in Serologic Tests for Diagnosis of Lyme Borreliosis", MAGNAREELI L.A. et al. (1996), *Journal of Clin. Microbiol.* 34: 2 pp 237-240
- "Immunological and Molecular Heterogeneity of the Outer Surface Protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato", HEIPKE S.J et al., pp 11-14
- "Identification of a Protein in Several *Borrelia* Species Which Is Related to OspC of the Lyme Disease Spirochetes, MARKONI R.T. et al. (1993), *Journal of Clin Microbiol.*, pp 2577-2583
- "Antigenic Variation and Variation in Expression of Immunodominant B. *Burgdorferi* Antigens: Implications for using Recombinant Antigens for Serodiagnosis", WILSKE B. et al., pp 179-182
- Review. "Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe Vector-borne and Zoonotic Disease.3", No. 4, 215 -227 (2003), Wilske B.
- "Characterisation of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI" (2003). Eicken C. et al. *Mol. Microbiol.* 47 (5), 1407-1417

1) EINLEITUNG

Die Bakterien *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *afzelii* und *garinii* sind die Erreger der am häufigsten durch Zecken übertragenen Infektionskrankheit Lyme-Borreliose. Die Infektion mit *Borrelia* ist durch eine Anzahl von klinischen Symptomen charakterisiert und wird in 3 Stadien unterteilt.

Stadium 1, als früh lokalisierte Hautrötung. Klinisch: Erythema migrans (Wanderröte).

Stadium 2, als früh disseminierende Erkrankung. Klinisch: lymphocytäre Meningoradikulitis (Bannwarth-Syndrom), Neuroborreliose.

Stadium 3, als spät disseminierende Erkrankung. Klinisch: chronisch progressive Enzephalomyelitis, Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), chronische Arthritis.

Um die Spezifität der Diagnostik zu erhöhen, wurden die Mikrotiterstrips des vorliegenden ELISA mit folgenden rekombinanten Antigenen beschichtet:

- p21 = OspC (outer surface protein C): *B. afzelii* (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C): *B. garinii* (20047)
- p41/I = (inner part of flagellin): *B. bavariensis* (pBi)
- VIsE: Fusionsprotein von unterschiedlichen *Borrelia* Genospezies

2) INHALT DES KITS

Alle Reagenzien mit Ausnahme des Waschpufferkonzentrats sind gebrauchsfertig. Lagerung aller Reagenzien bei 2-8°C.

CONT	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Mikrotiterplattenstreifen beschichtet mit rekombinanten Antigenen, einzeln brechbar, farbkodiert	12 x 8 Teste
STD	Standards: positiv (pos), cut-off (c.o.), negativ (neg), gebrauchsfertig	je 1 x 1,5 ml
CONJ	Konjugat: Kaninchen anti human IgM-HRPO, gebrauchsfertig	1 x 14 ml
DIL	Verdünnungspuffer, grün gefärbt, gebrauchsfertig	1 x 105 ml
SUB	Substrat: TMB Substratlösung, gebrauchsfertig	1 x 13 ml
WASHBUF	Waschpuffer: 20x konzentriert	1 x 50 ml
STOP	Stopplösung: Schwefelsäure, gebrauchsfertig	1 x 10 ml

3) ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- 2 selbstklebende Abdeckfolien
- Qualitätskontrollblatt
- Protokoll Blatt
- Arbeitsanleitung (Beipacktext)

4) ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10-1000 µl, inkl. Pipettenspitzen
- Mehrkanalpipette
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Halblogarithmisches Millimeterpapier oder Software
- Mikrotiterplatten Wascher wird empfohlen

5) REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Probenvorbereitung:

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma (EDTA, Citrat, Heparin, CPD). Durchführung der Zentrifugation des Blutes laut Herstellerangaben der Probenentnahmebehälter, so schnell wie möglich, um Hämolyse zu vermeiden. Liquor kann auch verwendet werden. Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination der Proben. Unlösliche Teile müssen vor Inkubation aus der Probe entfernt werden. Hitze-inaktivierte, ikterische, hämolytische, lipemische oder trübe Proben können nicht verwendet werden. Proben so schnell wie möglich messen oder sie können bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert werden. Für Langzeit Lagerung die Proben aliquotiert und bei -25°C oder tiefer lagern. Bis zu 3 Frier/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht.

Verdünnen der Patientenproben:

Serum oder Plasma 1:101 (1+100) mit Verdünnungspuffer verdünnen und gut mischen, z.B. 10 µl Patientenprobe + 1 ml Verdünnungspuffer.

Zerebrospinalflüssigkeit 1:2 (1+1) mit Verdünnungspuffer verdünnen und gut mischen, z.B. 100 µl Probe + 100 µl

Verdünnungspuffer.

Proben mit Werten >30 BBU/ml können mit Verdünnungspuffer verdünnt und nochmals getestet werden. Zur Berechnung des Endergebnisses müssen die erhaltenen Werte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Konjugat: Nach dem Öffnen soll das Konjugat innerhalb von 2 Wochen verwendet werden. Für längere Lagerung (bis zum Ablaufdatum) soll nicht verwendetes Konjugat aliquotiert und eingefroren werden.

Verdünnen des WASHBUF (Waschpuffer):

20fach Waschpufferkonzentrat auf 1000 ml mit destilliertem Wasser verdünnen (50 ml Konzentrat + 950 ml dest. Wasser). Gut mischen. Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur auf. Unverdünnter Waschpuffer ist bei 2-8°C bis zum Ablaufdatum (s. Etikett) haltbar. Der verdünnte Waschpuffer ist bei 2-8°C bis zu einem Monat haltbar. Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

STD: Standards (pos, cut-off, neg) sind gebrauchsfertig und dürfen nicht verdünnt werden.

6) TESTPRINZIP

Siehe 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7) TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für BLANK/STD/PROBE (Leerwert/Standard/Probe) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Alu Säckchen. Mindestens 1 Well für den Leerwert reservieren. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Alu Säckchen bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. Pipettieren Sie 100 µl STD /SAMPLE (Standard/Verdünnte Probe) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen, mit Ausnahme des Leerwertes.

2. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 37°C inkubieren.

3. Inhalt der Wells verwerfen und 4x mit mindestens 250 µl verdünnten WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähiges Papier entfernen.

4. Pipettieren Sie 100 µl CONJ (anti human IgM-HRPO) in alle Wells.

5. Streifen abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.

6. Inhalt der Wells verwerfen und 4x mit mindestens 250 µl verdünnten WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähiges Papier entfernen.

7. Pipettieren Sie 100 µl SUB (TMB Substrat) in alle Wells.

8. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren.

9. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Wells.

10. Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

Die Verwendung des Testsystems auf automatischen Systemen ist möglich, kann aber Modifikationen benötigen. Für eventuelle Hilfestellung wenden Sie sich bitte an die lokale Vertretung.

8) BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die Extinktion des Leerwertes (Blank) von den Extinktionen der restlichen Bestimmungen abziehen.

Mittelwerte der Extinktionen der Kontrollen und der Proben berechnen.

Der Messwert der Cut-off Kontrolle ist für die Beurteilung der Proben wichtig. Er entspricht 10 BBU/ml (Biomedica Borrelia Units) und ist die Basis für die Kalkulation der Ergebnisse.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU} / \text{ml}$$

Auf dem beige packten QC Protokoll sind die Resultate bei der QC Freigabe des Kits vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der optischen Dichte (OD) können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, solange die Daten welche unter 9) TESTMERKMALE angegeben sind, erreicht werden.

8.1. Qualitative Kalkulation für Serum/Plasma

Positives Ergebnis	Proben mit einer OD größer der des Cut-off +10% (≥ 11 BBU/ml)
Grenzwertiges Ergebnis	Proben zwischen 9 - 11 BBU/ml. Grenzwertige Ergebnisse sollten mit einer neuen Probenabnahme wiederholt werden.
Negatives Ergebnis	Proben mit einer OD kleiner der des Cut-off -10% (≤ 9 BBU/ml)

8.2. Quantitative Kalkulation für Serum/Plasma

Die Berechnung der BBU/ml erfolgt analog der qualitativen Auswertung, Kapitel 8.1.

Das Testsystem ist im Bereich von 5 - 30 BBU/ml linear. Werte außerhalb dieses Bereiches dürfen nur als semi-quantitativ betrachtet werden.

Alternativ können Proben mit Werten >30 BBU/ml mit Verdünnungspuffer verdünnt und nochmals getestet werden. Zur Berechnung des Endergebnisses müssen die erhaltenen Werte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Schwach positiv	Proben mit Werten zwischen 11 - 20 BBU/ml
Stark positiv	Proben mit Werten zwischen 21 - 30 BBU/ml
Sehr stark positiv	Proben mit Werten größer 30 BBU/ml

8.3. Qualitative Kalkulation für Zerebrospinalflüssigkeit

Die Berechnung der BBU/ml erfolgt analog der qualitativen Auswertung, Kapitel 8.1.

Normalwerte CSF: Es wurden 30 Liquor Proben getestet und durchschnittlich 1,3 BBU/ml gefunden.

Neuroborreliose Negativ	Proben mit Werten ≤ 5 BBU/ml
Verdacht auf Neuroborreliose	Proben mit Werten > 5 BBU/ml

9) TESTMERKMALE

Gültigkeit der Bestimmung:

Leerwert	Die OD muss $\leq 0,250$ sein
Negativer Standard	Die OD muss $\leq 0,200$ sein (Leerwert abgezogen)
Cut-off Standard	Die OD muss mindestens 2x so hoch wie der negative Standard sein (Leerwert abgezogen)
Positiver Standard	Die OD muss mindestens 2x so hoch wie der Cut-off Standard sein (Leerwert abgezogen)

Kreuzreaktionen:

	n	Reaktiv
Rheumafaktor positive Proben	15	1
Syphilis positive Proben	7	0

Trotz Verwendung von rekombinanten Antigenen kann eine Kreuzreaktion zu autoimmun-positiven Proben nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Spezifität & Sensitivität:

	Serum	CSF
Sensitivität	100%	82%
Spezifität	96%	91%

10) PRÄZISION

Intra-assay	pos (n=12)	stark pos (n=12)	Inter-assay	pos (n=17)	stark pos (n=20)
Mittelwert (BBU/ml)	24	38	Mittelwert (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
VK (%)	6,7	6,8	VK (%)	8,3	8,1

11) TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Testen dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel oder Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden. Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien

12) VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak, HCV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Die flüssigen Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 950 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 950 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe zur Vermeidung jedes Kontaktes mit Reagenzien.
- Schwefelsäure reizt die Augen und die Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

13) LITERATUR

Siehe 13) *LITERATURE* im englischen Teil des Beipacktextes.

1) ÚVOD

Lymfická borrelióza je bakteriální infekce vyvolaná spirochetou *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, Afzelli nebo Garinii a je charakterizována různými klinickými příznaky. Onemocnění je rozdělováno do tří stadií.

1. stadium časná dermatitida, klinicky erythema migrans.
2. stadium časná diseminovaná infekce, klinicky lymfocytická meningoradiculitida (Bannwarthův syndrom), neuroborrelióza.
3. stadium pozdní diseminovaná infekce, klinicky chronická progresivní encefalomyelitida, chronická atrofující akrodermatitida, chronická artritida.

Pro zvýšení diagnostické specifity jsou jamky destiček soupravy Biomedica potaženy těmito rekombinantními antigeny:

- p21 = OspC (outer surface protein C – vnější povrchový protein C): B. afzelli (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C – vnější povrchový protein C): B. garinii (20047)
- p41/I = (inner part of flagellin – vnitřní část flagellinu): B. bavariensis (pBi)
- VlsE: směsné protein jiných genotypů *Borrelia*

2) OBSAH SOUPRAVY

Všechny reagenty v soupravě vyjma promývací pufr jsou k okamžitému použití. Souprava se všemi reagenty se uchovává při teplotě 2-8°C.

REAGENCIE	POPIS	MNOŽSTVÍ
PLATE	Stripy s jamkami, potaženými antigenem, Oddělují se odlamováním, jsou barevně kódované.	12 x 8 stripů
STD	kontroly: pozitivní (pos), hraniční (cut-off, c.o.), negativní (neg), používají se přímo	každá 1 x 1,5 ml
CONJ	konjugát králičí anti human IgM – HRPO, používá se přímo	1 x 14 ml
DIL	roztok na ředění vzorků, používá se přímo	1 x 105 ml
SUB	roztok TMB substrátu, používá se přímo	1 x 13 ml
WASHBUF	promývací pufr 20 x koncentrovan	1 x 50 ml
STOP	stop roztok konc. kys. sírová, používá se přímo	1 x 10 ml

3) DALŠÍ PŘÍSLUŠENSTVÍ SOUPRAVY

- 2 samolepící folie
- kontrolní list kvality
- protokol provedení testu
- návod k používání soupravy

4) ZAŘÍZENÍ POTŘEBNÉ K PROVEDENÍ TESTU (nedodává se v soupravě)

- přesné kalibrované mikropipety na objemy 10 µl – 1000 µl
- vícekanálové mikropipety
- ELISA mikrofotometr s filtrem 450nm nebo s filtry 450 nm a 630 nm.
- Milimetrový papír nebo program pro výpočet výsledků.
- Doporučuje se promývačka na promývání destiček

5) PŘÍPRAVA REAGENCIÍ A VZORKŮ

Příprava vzorku:

Vzorkem může být sérum nebo plasma (EDTA, citrát, heparin, CPD), které musí být separovány od krevních sraženin a buněk co možná nejdříve, aby nedocházelo k hemolýze. Rovněž lze použít mozkomíšni mok. Vyvarujte se mikrobiální kontaminace vzorků. Nerozpustné látky musí být ze vzorku odstraněny před inkubací. Použití tepelně inaktivovaných, ikerických, hemolytických, lipemických nebo zakalených vzorků se nedoporučuje.

Upozornění: pokud se neprovádí testy bezprostředně, mohou se vzorky skladovat při 2-8°C po dobu až 2 týdnů. Delší skladování vzorků je možné při teplotě -25°C nebo nižší. Opakované zmrazování a tání vzorků se nedoporučuje kvůli riziku nesprávných výsledků. Vyvarujte se více než 3 cyklů zmrazení-tání.

Ředění vzorků: Naředte lidské sérum nebo plazmu 1:101 (1+100) roztokem na ředění vzorků (10 µl vzorku a 1 ml roztoku na ředění vzorků) a dobře se promíchá.

Mozkomíšni mok se ředí 1: 2 (1+1) roztokem naředění vzorků (100 µl vzorku a 100 µl roztoku na ředění vzorků) a dobře se promíchá.

Vzorky s výsledky >30 BBU/ml mohou být ředěny diluentem a opětovně testovány. Získané výsledky musí být násobeny odpovídajícím faktorem ředění na výslednou koncentraci.

Konjugát: Konjugát křímému použití by měl být spotřebován do dvou týdnů po otevření. Pro dlouhodobé skladování nepoužitý konjugát rozdělte na alikvoty a uložte při -25°C do data expirace.

Příprava promývacího pufru: Koncentrovaný promývací pufr WASHBUF se zředí destilovanou vodou na 1000 ml (50 ml koncentrovaného pufru se přidá k 950 ml destilované nebo deionizované vody) a dobře se promíchá. Případné krystaly se rozpustí při teplotě laboratoře. Naředěný promývací pufr je stálý při 2-8°C až do data expirace, které je uvedeno na štítku.

STD: Standardy (pos, cut-off, neg) jsou určeny přímo k použití a NESMÍ se ředit.

6) PRINCIP STANOVENÍ

Viz. 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY v anglické části této příbalové informace.

7) PROVEDENÍ TESTU

Všechny reagenty a vzorky musí být před prováděním testu vyteperovány na teplotu laboratoře 18-26°C.

Na protokolu provedení testu se vyznačí jamky pro slepou, kontroly a vzorky.

Ze sáčku se vyjmou stripy s jamkami, nejméně jedna jamka se použije pro slepou (blank). Nepoužité stripy se vloží zpět do sáčku s vysoušedlem a uloží při teplotě 2-8°C. Stripy jsou stálé až do data expirace, které je uvedeno na sáčku.

1. Do určených jamek se napipetuje 100 µl kontrol a vzorků, jamka pro slepou se vynechá.

2. **Jamky se zakryjí samolepící fólií a inkubují se 1 hodinu v inkubátoru při teplotě 37°C.**

3. Po skončení inkubace se z jamek odsaje kapalina a jamky se promyjí 4 x nejméně 250 µl naředěného promývacího pufru. Po skončeném promývání se zbytky pufru odstraní z jamek poklepáním stripem na filtrační papír.

4. Do všech jamek se napipetuje 100 µl konjugátu.

5. **Jamky se zakryjí samolepící fólií a inkubují se 30 minut při teplotě laboratoře 18-26°C.**

6. Po skončení inkubace se z jamek odsaje kapalina a jamky se promyjí 4 x nejméně 250 µl naředěného promývacího pufru. Po skončeném promývání se zbytky pufru odstraní z jamek poklepáním stripem na filtrační papír.

7. Do všech jamek se napipetuje 100 µl TMB substrátu.

8. **Inkubuje se 15 minut ve tmě při teplotě laboratoře 18-26°C.**

9. Do všech jamek se napipetuje 50 µl stop roztoku.

10. Ihned se změří absorbance jamek OD při 450 nm a pokud je možné také při referenčním filtru 630 nm.

Test lze provádět v automatickém ELISA systému, ale vyžaduje některé modifikace. Pokud byste potřebovali pomoc, obraťte se na našeho zástupce.

8) VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Od absorbance OD vzorků a kontrol se odečte OD slepé a vypočítají se průměrné hodnoty OD všech standardů a vzorků. Hodnota OD hraniční (cutoff) reprezentuje 10 BBU/ml (Biomedica Borrelia Units) a je základem pro výpočet výsledků.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU / ml}$$

V protokolu o kontrole kvality, který je dodáván s kitem, jsou uvedeny výsledky výstupní kontroly pro každý kit. Data optické density, která jsou získána koncovými uživateli, se mohou lišit od dat kontroly kvality v důsledku různých vlivů a/nebo normálního poklesu intenzity signálu v průběhu doby životnosti soupravy. To však nemá vliv na validitu výsledků, pokud je dosaženo výsledků tak jak je uvedeno v části 9) Charakteristika stanovení.

8.1. Kvalitativní výpočet pro sérum a plasmu

Positivní výsledek:	vzorky s hodnotou OD větší o 10% než hraniční ≥ 11 BBU/ml.
Neurčitý výsledek:	vzorky s OD mezi 9 BBU/ml – 11 BBU/ml (šedá zóna). U těchto nemocných se musí vyšetřit vzorek z nového odběru.
Negativní výsledek:	vzorky s hodnotou menší o 10% než hraniční ≤ 9 BBU/ml.

8.2. Kvantitativní výpočet pro sérum a plasmu

Výpočet BBU/ml je stejný jako v odstavci 8.1.

Výsledky testu jsou lineární v rozmezí 5 BBU/ml – 30 BBU/ml, výsledky mimo tento rozsah jsou semikvantitativní.

Případně vzorky s výsledky >30 BBU/ml mohou být ředěny diluentem a opětovně testovány. Získané výsledky musí být násobeny odpovídajícím faktorem ředění na výslednou koncentraci.

Slabě pozitivní	hodnoty od 11 BBU/ml do 20 BBU/ml.
Pozitivní	hodnoty od 21 BBU/ml do 30 BBU/ml.
Vysoko pozitivní	hodnoty vyšší než 30 BBU/ml.

8.3. Kvantitativní výpočet pro mozkomíšni mok

Výpočet BBU/ml je stejný jako výpočet v odstavci 8.1.

Normální hodnota: bylo zjištěno, že průměrná hodnota z 30 vzorků mozkomíšního moku je 1,3 BBU/ml.

Neuroborreliosa negativní.	vzorky s hodnotou ≤ 5 BBU/ml.
Suspektní neuroborreliosa:	vzorky s hodnotou > 5 BBU/ml.

9) CHRAKTERISTIKA TESTU

Platné (validní) výsledky:

blank	Hodnota OD musí být $< 0,250$
negativních kontrol	Hodnota OD musí být $< 0,200$ (odečtený blank)
hraniční musí být	Hodnota OD musí být nejméně dvojnásobek negativní kontroly (odečtený blank).
pozitivní kontroly	Hodnota musí být nejméně dvojnásobek hraniční kontroly (odečtený blank).

Zkržžená reaktivita:

	počet vyšetření	výsledek
Revmatoidní faktor	15	1
Syfilis pozitivita	7	0

Zkržžená reaktivita nebyla s těmito faktory pozorována, vzhledem k tomu, že tato souprava ELISA používá rekombinantní antigeny. Nicméně nelze zkržženou reaktivitu zcela vyloučit u vzorků od pacientů s autoimunním onemocněním.

Specifita & Citlivost:

	Sérum	CSF
Citlivost	100%	82%
Specifita	96%	91%

10) PŘESNOST

vnitřní	poz (n=12)	vys. poz. (n=12)	mezi testy	poz (n=17)	vys. poz (n=20)
Aritmetický průměr (BBU/ml)	24	38	Aritmetický průměr (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
CV (%)	6,7	6,8	CV (%)	8,3	8,1

SD – směrodatná odchylka; CV – variační koeficient

11) TECHNICKÉ POKYNY

- Nikdy nenahrazujte nebo nesmíchávejte reagensy z jiných šarží nebo souprav.
- Při míchání reagensů nesmí dojít k tvorbě pěny.
- Nezaměňujte zátky nebo uzávěry mezi reagensy a nepoužívejte je z jiných šarží nebo souprav.
- Nikdy nepoužívejte reagensy po jejich datu expirace. Nevystavujte reagensy působení přímého světla.
- Substrátový roztok vždy musí být bezbarvý.

12) BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Všechny reagensy lidského původu v soupravě byly testovány soupravami 3. generace na přítomnost protilátek proti HIV a antigen, HCV a antigen, HBSAg a bylo zjištěno, že jsou negativní. Nicméně musí být s nimi zacházeno jako kdyby byly infekční. Kapalně reagensy obsahují $\leq 0,1\%$ Proclin 950 jako konzervant. Vyvarujte se potřísnění pokožky nebo sliznic

touto látkou. Proclin 950 není toxický v koncentracích, ve kterých je obsažen v reagentech této soupravy. Může vyvolat alergické reakce kůže, nesmí přijít do styku s kůží nebo zrakem.

- Nepipetujte ústy.
- Nejezte, nepijte, nekuřte a nepoužívejte kosmetiku, když pracujete se soupravou.
- Vyvarujte se kontaktu reagentů s pokožkou, vždy používejte rukavice na jedno použití.
- Kyselina sírová vyvolává poleptání kůže, očí a sliznic. Pokud dojde k potřísnění touto reagentem, musí se ihned potřísněné místo opláchnout velkým množstvím vody, případně vyhledat lékařskou pomoc.

13) LITERATURA

Viz. 13) *LITERATURE* v anglické části této příbalové informace.

1) ÚVOD

Lymfická borelióza je bakteriálna infekcia spôsobená spirochetou *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Azellei* alebo *Garinii* a je charakterizovaná viacerými klinickými symptómami. Infekcia boreliou sa môže deliť do troch štádií:

Štádium 1, skorý dermatitís, Klinicky: erytéma migrans.

Štádium 2, skorá diseminovaná infekcia, Klinicky: lymfocytárna meningoradiculitída (Bannwarthov syndróm), neuroborelióza.

Štádium 3, pozdná diseminovaná infekcia, Klinicky: chronická progresívna encefalomyelitída, acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), chronická artritída.

Pre zlepšenie diagnostickej špecificity sú mikrostripy od firmy Biomedica potiahnuté nasledujúcimi rekombinantnými antigénmi:

- p21 = OspC (outer surface protein C – vonkajší povrchový proteín C): *B. azellei* (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C – vonkajší povrchový proteín C): *B. garinii* (20047)
- p41/I = (inner part of flagellin – vnútorná časť flagelínu): *B. bavariensis* (pBi)
- VisE: proteín fúzie rôznych génových druhov borrelie

2) ZLOŽENIE SÚPRAVY

Všetky reagenty okrem premyvacieho roztoku sa používajú neriedené. Skladujú sa pri 2-8°C.

OZNAČENIE	KOMPONENTY SÚPRAVY	MNOŽSTVO
PLATE	Mikrostripy, odlomiteľné, farebne označené, potiahnuté rekombinantným antigénom	12 x 8 testov
STD	Štandardy: pozitívny, hraničný, negatívny, pripravené na použitie	každý 1 x 1,5 ml
CONJ	Konjugát: králičí antihumánny IgM HRPO, pripravený na použitie	1 x 14 ml
DIL	Roztok na riedenie vzoriek, obsahujúci zelené farbivo, pripravený na použitie	1 x 105 ml
SUB	Substrát: TMB substrátový roztok, pripravený na použitie	1 x 13 ml
WASHBUF	Premyvaci roztok: 20x koncentrovaný	1 x 50 ml
STOP	Stop roztok: kyselina sírová, pripravená na použitie	1 x 10 ml

3) MATERIÁLY DODÁVANÉ V SÚPRAVE

- 2 samolepiace fólie na prelepenie platničiek
- kontrolný list kvality
- pomocná tabuľka k platničke
- návod na použitie

4) ZARIADENIA NA STANOVENIE TESTU – NEDODÁVANÉ

- mikropipety kalibrované na dávkovanie 10 – 1000 µl a vymeniteľné špičky
- multikanálová pipeta
- ELISA spektrofotometer s vlnovou dĺžkou 450 nm (prípadne od 450 do 630nm)
- milimetrový papier alebo počítačový program na výpočet výsledkov
- odporúčame premyvačku platničiek

5) PRÍPRAVA REAGENCIÍ A VZORIEK

Príprava vzorky:

Vzorka môže byť sérum alebo plazma (EDTA, citrát, heparín, CPD), ktoré sa musia čo najskôr po odbere vzoriek krvi oddeliť od krvnej zrazeniny, aby sa zabránilo hemolyze. Môže sa použiť aj mozgový miešny mok. Zabráňte mikrobiálnej kontaminácii vzoriek. Nerozpustné látky sa musia zo vzorky odstrániť pred inkubáciou. Použitie tepelne inaktivovaných, ikterických, hemolytických, lipemických alebo zakalených vzoriek sa neodporúča.

Upozornenie: Ak sa testy nevykonajú ihneď, vzorky sa môžu skladovať až 2 týždne pri teplote + 4 ° C. Predĺžené skladovanie vzoriek je možné pri teplote -25 ° C alebo nižšej. Opakované zmrazenie a rozmrazovanie vzoriek sa neodporúča kvôli riziku nepresných výsledkov. Vyvarujte sa viac ako troch cyklov zmrazovania a rozmrazovania.

Riedenie vzoriek: Ľudské sérum alebo plazmu nariedte v pomere 1:101 (1+ 100) s riediacim roztokom pre vzorky (t.j. 10 µl vzorky + 1 ml riediaceho roztoku), dobre premiešajte.

Nariedte likvor v pomere 1:2 (1+ 1) s riediacim roztokom pre vzorky (t.j. 100 µl vzorky + 100 µl riediaceho roztoku), dobre premiešajte.

Vzorky s výsledkami > 30 BBU/ml môžu byť nariadené roztokom na riedenie vzoriek a znovu pretestované. Namerané výsledky musia byť vynásobené príslušným riediacim faktorom pre získanie finálnej koncentrácie.

Konjugát, pripravený na použitie, spotrebujte do 2 týždňov po otvorení. Pre dlhodobé uskladnenie nepoužitý konjugát rozdeľte na alikvotné časti a uskladnite zmrazený pri -25°C až do doby expirácie.

Príprava WASHBUF (premyvacieho roztoku): Nariadte 20x koncentrovaný premyvaci roztok destilovanou vodou do 1000 ml (50 ml koncentrátu + 950 ml destilovanej vody). Dobre premiešajte. Kryštály, ktoré sa môžu objaviť, sa rozpúšťajú pri laboratórnej teplote. Nariadený premyvaci roztok je stabilný pri teplote 2-8°C až do doby expirácie vyznačenej na etike. Nariadený premyvaci roztok je stabilný pri teplote 2-8°C jeden mesiac.

STD: Štandardy (negatívne, cut-off, pozitívne) sú pripravené na použitie a NESMÚ sa riediť.

6) PRINCÍP STANOVENIA

Viď 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY v anglickej časti textu na obale.

7) POSTUP STANOVENIA

Pred stanovením sa všetky reagenty a vzorky temperujú na laboratórnu teplotu (18-26°C).
Na priloženej pomocnej tabuľke platníčky označte miesta pre BLANK/STD/SAMPLE (slepý pokus, štandard a vzorky).
Vyberte potrebný počet mikrostripy z alobalu. Označte minimálne jednu jamku ako slepý pokus. Nepoužité stripy skladujte spolu s desikantom pri 2-8°C v uzavretom allobalovom obale. Mikrostripy sú stabilné do doby expirácie vyznačenej na etike.
1. Napipetujte 100 µl STD/SAMPLE (štandardov a nariadených vzoriek) do príslušných jamiek, okrem slepého pokusu.
2. Stripy zalepte samolepiacou fóliou a nechajte inkubovať 1 hodinu pri teplote 37°C v inkubátore.
3. Premývačkou odsajte obsah jamiek a jamky premyte najmenej 4x s 250 µl zriedeného WASHBUF (premyvacieho roztoku). Po skončení premyvania sa stripy osušia odklepaním zvyšného premyvacieho roztoku na filtračný papier alebo buničitú vatú.
4. Napipetujte 100 µl CONJ (konjugát antihumány IgM-HRPO) do všetkých jamiek.
5. Stripy zalepte samolepiacou fóliou a nechajte inkubovať 30 minút pri laboratórnej teplote (18-26°C).
6. Premývačkou odsajte obsah jamiek a jamky premyte najmenej 4x s 250 µl zriedeného WASHBUF (premyvacieho roztoku). Po skončení premyvania sa stripy osušia odklepaním zvyšného premyvacieho roztoku na filtračný papier alebo buničitú vatú.
7. Napipetujte 100 µl SUB (TMB substrátu) do všetkých jamiek.
8. Nechajte inkubovať 15 min pri laboratórnej teplote (18-26°C) v tme.
9. Napipetujte 50 µl STOP (stop roztoku) do všetkých jamiek.
10. Ihneď zmerajte absorbciu pomocou spektrofotometra pri 450 nm s použitím referenčného filtra 630 nm, ak je referenčný filter k dispozícii.

Na stanovenie je s malými modifikáciami možné použiť automatický systém. Pre doplňujúce informácie, prosím, kontaktujte Vášho obchodného zástupcu.

8) VÝPOČET VÝSLEDKOV

Odpočítajte hodnotu absorbcie (OD) slepého pokusu od hodnôt absorbcí vzoriek a štandardov.

Vypočítajte priemernú hodnotu absorbcí všetkých vzoriek a štandardov.

Hodnota absorbcie hraničného (cut-off) štandardu predstavuje 10 BBU/ml (Biomedica Borrelia Units). Táto hodnota je základom pre výpočet výsledkov.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU} / \text{ml}$$

Kontrólly list kvality dodávaný v stanovovacej súprave uvádza výsledky získané pri výstupnej kontrole kvality pre každú šaržu. Hodnoty absorbcí namerané zákazníkmi sa však môžu líšiť v závislosti od rôznych vplyvov a/alebo následkom normálneho poklesu intenzity signálu v priebehu doby životnosti. Validita výsledkov však nie je ovplyvnená, pokiaľ namerané dáta spĺňajú podmienky uvedené v kapitole 9) ŠPECIFICKÁ CHARAKTERISTIKA TESTOV.

8.1. Kvalitatívny výpočet pre sérum / plazmu

Pozitívny výsledok	Vzorky s OD väčšou ako hraničný štandard +10% (≥ 11 BBU/ml)
Hraničný výsledok	Vzorky medzi 9 – 11 BBU/ml. Títo pacienti by mali byť znovu vyšetrení s novou vzorkou.
Negatívny výsledok	Vzorky s OD menšou ako hraničný štandard -10% (≤ 9 BBU/ml)

8.2. Kvantitatívny výpočet pre sérum / plazmu

Výpočet jednotiek BBU/ml je rovnaký ako pri kvalitatívnom výpočte, kapitola 8.1.

Výsledky sú lineárne v rozmedzí 5 - 30 BBU/ml. Hodnoty mimo tohto rozpätia sú semi-quantitatívne.

Alternatívne, vzorky s výsledkami > 30 BBU/ml môžu byť nariadené roztokom na riedenie vzoriek a znovu pretestované.

Namerané výsledky musia byť vynásobené príslušným riediacim faktorom pre získanie finálnej koncentrácie.

Slabo pozitívne	Vzorky medzi 11 a 20 BBU/ml
Silne pozitívne	Vzorky medzi 21 a 30 BBU/ml
Veľmi silne pozitívne	Vzorky nad 30 BBU/ml

8.3. Kvalitatívny výpočet pre likvor

Výpočet jednotiek BBU/ml je rovnaký ako pri kvalitatívnom výpočte, kapitola 8.1.

Referenčné hodnoty likvoru: Priemerná hodnota z 30 vzoriek likvoru bola 1,3 BBU/ml.

Neuroborelióza - negatívna	Vzorky s hodnotami ≤ 5 BBU/ml
Podozrenie na neuroboreliózu	Vzorky s hodnotami > 5 BBU/ml

9) ŠPECIFICKÁ CHARAKTERISTIKA TESTOV

Validácia výsledkov:

Slepý pokus	Hodnoty OD musia byť $\leq 0,250$
Negatívny štandard	Hodnoty OD musia byť $\leq 0,200$ (odpočítaná hodnota slepého pokusu)
Hraničný štandard	Hodnoty OD musia byť minimálne dvojnásobkom hodnoty negatívneho štandardu (odpočítaná hodnota slepého pokusu)
Pozitívny štandard	Hodnoty OD musia byť minimálne dvojnásobkom hodnoty hraničného štandardu (odpočítaná hodnota slepého pokusu)

Skrížené reakcie

	n	skrížená reakcia
reumatoidný faktor - pozitívny	15	1
syfilis - pozitívny	7	0

Táto ELISA metódika používa rekombinantné antigény. Napriek tomu nemožno úplne vylúčiť krížové reakcie na autoimunopozitívne vzorky.

Senzitivita: & špecifickosť:

	sérum	CSF
senzitivita	100%	82%
špecifickosť	96%	91%

10) PRESNOSŤ

V rámci testu	pozitívne (n = 12)	vysoko pozitívne (n = 12)	Medzi testami	pozitívne (n = 17)	vysoko pozitívne (n = 20)
Priemer (BBU/ml)	24	38	Priemer (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
CV (%)	6,7	6,8	CV (%)	8,3	8,1

11) TECHNICKÉ POKYNY

- Nevymieňajte jednotlivé komponenty súpravy medzi rôznymi šaržami súpravy.
- Zabráňte tvorbe peny pri miešaní reagensí.
- Nezamieňajte viečka a uzávery na rôznych flaštičkách alebo medzi flaštičkami z rôznych šarží.
- Nepoužívajte jednotlivé komponenty súpravy po uplynutí doby expirácie. Chráňte reagentie pred svetlom.
- Roztok substrátu má zostať bezfarebný až do doby, kým nie je napipetovaný na platničku.

12) BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Všetky zložky súpravy ľudského pôvodu boli testované treťou generáciou testov proti HIV-Ab, HCV-Ab a HBsAg a sú negatívne. Napriek tomu je potrebné s nimi zaobchádzať podľa pokynov na manipuláciu s infekčným materiálom. Všetky kvapalné reagenty obsahujú $\leq 0,1\%$ Proclinu 950 ako konzervačného prípravku. Štandardy boli stanovené na bunkových kultúrach a nie sú infekčné. Napriek tomu treba s nimi zaobchádzať podľa pokynov na manipuláciu s infekčným materiálom. Zabráňte jeho kontaktu s pokožkou a mukóznou sliznicou.

- Nepipetujte ústami.
- V priestoroch kde sa používajú reagenty nejedzte, nepite, nefajčíte a nepoužívajte kozmetické prípravky.
- Vylúčte akýkoľvek kontakt s reagentami používaním rukavíc.
- Kyselina sírová dráždi oči a pokožku. V prípade kontaktu s kyselinou, zasiahnuté miesto ihneď umyte tečúcou vodou. Zabráňte kontaktu kyseliny s pokožkou a sliznicou – môžu vzniknúť podráždeniny. V prípade kontaktu umyte tečúcou vodou!

13) LITERATÚRA

Viď 13) LITERATURE v anglickej časti textu na obale.

1) WSTĘP

Borelioza z Lyme jest bakteryjną infekcją wywołaną przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *afzelii* lub *garinii*.

Choroba charakteryzuje się wieloma różnymi objawami. Występowanie, których można podzielić na 3 etapy:

Etap 1, wczesne zapalenie skóry, objawy kliniczne: rumień wędrujący.

Etap 2, wczesna rozsiana infekcja, objawy kliniczne: limfocytarne zapalenie opon i korzeni nerwowych (zespół Bannwarth'a), neuroborelioza.

Etap 3, późna rozsiana infekcja, objawy kliniczne: przewlekłe, postępujące zapalenie mózgu i rdzenia, zanikowe zapalenie skóry, przewlekłe zapalenie stawów.

Dla poprawy specyficzności diagnostycznej dolki mikroplastyki opłaszczono następującymi antygenami rekombinowanymi:

- p21 = OspC (outer surface protein C - zewnętrzne powierzchniowe białko C): *B. afzelii* (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C - zewnętrzne powierzchniowe białko C): *B. garinii* (20047)
- p41/I = (część wewnętrzna flagelliny): *B. bavariensis* (pBi)
- VlsE: białko fuzyjne różnych genogatunków *Borrelia*

2) SKŁAD ZESTAWU

Wszystkie odczynniki z wyjątkiem buforu są gotowe do użycia. Przechowywać w 2-8°C.

NAZWA	SKŁADNIKI ZESTAWU	ILOŚĆ
PLATE	Łamane paski, oznaczone kolorem, opłaszczono rekombinowanymi antygenami	12 x 8 dółków
STD	Standardy: dodatni (pos), cut-off (c.o.), ujemny (neg), gotowe do użycia	Każdy po 1 x 1,5 ml
CONJ	Koniugat: królicze anty-ludzkie IgM-HRPO, gotowy do użycia	1 x 14 ml
DIL	Rozcieńczalnik do próbek z zielonym barwnikiem, gotowy do użycia	1 x 105 ml
SUB	Substrat: roztwór TMB, gotowy do użycia	1 x 13 ml
WASHBUF	Bufor płuczący: stężony 20x	1 x 50 ml
STOP	Roztwór hamujący: kwas siarkowy, gotowy do użycia	1 x 10 ml

3) DODATKOWE MATERIAŁY DOSTARCZONE W ZESTAWIE

- 2 folie samoprzylepne
- Protokół kontroli jakości
- Protokół roboczy
- Instrukcja wykonania

4) PRZYRZĄDY DO WYKONANIA TESTU – NIE DOSTARCZONE

- Mikropipety o pojemnościach 10 - 1000 µl i jednorazowe końcówki
- Pipeta wielokanałowa
- Czytnik mikroplatek Elisa z filtrem 450 nm (ewentualnie od 450 nm do 630 nm), papier milimetrowy lub program do obliczania wyników
- Zaleca się użycie automatycznej płuczki do mikroplatek

5) PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW I PRÓBEK

Przygotowanie próbek:

Jako próbki można użyć surowicy lub osocza (EDTA, cytrynianowego, heparynowego, CPD), które muszą zostać oddzielone od skrzepu najszybciej jak jest to możliwe po pobraniu krwi, aby zapobiec hemolizie. Można również użyć płynu mózgowo-rdzeniowego. Nie dopuścić do mikrobiologicznego zanieczyszczenia próbki. Substancje nierozpuszczalne muszą zostać usunięte z próbki przed inkubacją. Nie zaleca się używania próbek inaktywowanych ciepłnie, ikterycznych, hemolitycznych, lipemicznych lub mętnych.

Uwaga: Jeśli badania nie będą przeprowadzane od razu, próbki mogą być przechowywane w temp. +4°C do dwóch tygodni. Dłuższe przechowywanie próbek jest możliwe w temp. -25°C lub niższej. Nie zaleca się powtórnego zamrażania/rozrażania próbek z uwagi na ryzyko uzyskania niedokładnych wyników. Unikać przeprowadzania więcej niż 3 cykli zamrożenia/rozrażenia.

Rozcieńczanie próbek: Rozcieńczyć surowice lub osocze 1:101 (1+100) (np. 10 µl próbki + 1 ml rozcieńczalnika), dokładnie wymieszać.

Płyn mózgowo-rdzeniowy rozcieńczać w stosunku 1:2 (1+ 1) rozcieńczalnikiem do próbek (np. 100 µl próbki + 100 µl rozcieńczalnika), dokładnie wymieszać.

Dla próbek o wartościach powyżej 30 BBU/ml można wykonać dodatkowe rozcieńczenie (przy pomocy rozcieńczalnika do

próbek) i ponownie przeprowadzić analizę. Uzyskany w ten sposób wynik należy pomnożyć zgodnie ze stopniem dodatkowego rozcieńczenia.

Koniugat: Gotowy do użycia koniugat powinien zostać zużyty w trakcie 2 tygodni po otwarciu.

Dla dłuższego przechowywania do daty ważności nie zużyty koniugat rozpipetować na porcje i zamrozić w -25°C.

Przygotowanie buforu płuczającego: Dopelnąć skoncentrowany (20x) bufor wodą destylowaną do 1000 ml (50 ml buforu + 950 ml wody destylowanej). Dokładnie wymieszać. Jeżeli w koncentracji wytrąca się kryształy, powinny rozpuścić się w temperaturze pokojowej. Nierozcieńczony bufor płuczający jest stabilny w temp. 2-8°C do daty podanej na etykiecie. Po rozcieńczeniu bufor stabilny jest przez okres jednego miesiąca w temp. 2-8°C.

STD: standardy (negatywny, cut-off, pozytywny) są gotowe do użycia i NIE WOLNO ich rozcieńczać.

6) ZASADA OZNACZANIA

Zobacz 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* – rysunek w angielskiej części ulotki.

7) PROTOKÓŁ TESTU

Wszystkie odczynniki i próbki przed wykonaniem testu przenieść do temperatury pokojowej (18-26°C).
Zaznaczyć pozycje dla ślepej (blank) / standardów / próbek na protokole roboczym.
Wyjąć z aluminiowej torebki odpowiednią ilość dołków. Przygotować przynajmniej jeden dołek na blank. Nieużywane dołki schować do torebki ze środkiem osuszającym i umieścić w temperaturze 2-8°C. Dołki są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie.
1. Dodać 100 µl standardów i rozcieńczonych próbek do odpowiednich dołków, oprócz blanku.
2. Zakleić dołki folią i inkubować 1 godzinę w 37°C.
3. Odessać płyn z dołków i wypłukać je 4x 250 µl rozcieńczonym buforem płuczającym. Po płukaniu usunąć resztki buforu poprzez odwrócenie na bibule i ostukanie dołków.
4. Dodać 100 µl koniugatu (anty-ludzkie IgM-HRPO) do wszystkich dołków.
5. Zakleić dołki folią i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej (18-26°C).
6. Odessać płyn z dołków i wypłukać je 4x 250 µl rozcieńczonym buforem płuczającym. Po płukaniu usunąć resztki buforu poprzez odwrócenie na bibule i ostukanie dołków.
7. Dodać 100 µl substratu (TMB) do wszystkich dołków.
8. Inkubować 15 minut w temperaturze pokojowej (18-26°C), w ciemności.
9. Dodać 50 µl roztworu hamującego do wszystkich dołków.
10. Natychmiast odczytać absorbancję przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym 630 nm (jeżeli jest dostępny).

Możliwe jest użycie systemu automatycznego, lecz może wymagać to pewnych modyfikacji. W razie potrzeby prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem.

8) OBLICZANIE WYNIKÓW

Odjąć absorbancję blanku od absorbancji próbek i standardów.

Obliczyć średnie absorbancje wszystkich próbek i standardów.

Absorbancja standardu cutoff odzwierciedla wartość 10 BBU/ml (Biomedica Borrelia Units). Jest to podstawą obliczania wyników.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU} / \text{ml}$$

Protokół Kontroli Jakości dostarczony z testem zawiera wyniki ostatecznego sprawdzianu kontroli jakości dla każdego zestawu. Odczyty gęstości optycznej wykonane przez użytkownika mogą różnić się spowodowane wpływem terminu ważności. Jednakże nie ma to wpływu na kryteria walidacji testu dopóki dane zawarte w rozdziale 9) Charakterystyka testu są spełnione.

8.1. Kalkulacja jakościowa dla surowicy/osocza

Wynik dodatni	próbki o ABS wyższej od cut-off +10% (≥ 11 BBU/ml).
Wynik wątpliwy	próbki pomiędzy 9 - 11 BBU/ml. Zaleca się powtórzenie z nowo pobraną próbka.
Wynik ujemny	próbki o ABS niższej od cut-off -10% (≤ 9 BBU/ml).

8.2. Kalkulacja ilościowa dla surowicy/osocza

Kalkulacja BBU/ml jest identyczna jak kalkulacja jakościowa, punkt 8.1.

Test zachowuje liniowość w zakresie 5 - 30 BBU/ml. Wartości poza tym zakresem są półilościowe.

Ewentualnie, próbki z wynikiem >30BBU/ml mogą być dodatkowo rozcieńczone (przy pomocy rozcieńczalnika do próbek) i ponownie oznaczone. Uzyskany wniki koniecznie należy pomnożyć przez stopień dodatkowego rozcieńczenia.

Nisko dodatni	Próbki pomiędzy 11 i 20 BBU/ml.
Wysoko dodatni	Próbki pomiędzy 21 i 30 BBU/ml.
Bardzo wysoko dodatni	Próbki powyżej 30 BBU/ml.

8.3. Kalkulacja jakościowa dla płynu mózgowo-rdzeniowego

Kalkulacja BBU/ml jest identyczna jak kalkulacja jakościowa, punkt 8.1.

Wartości normalne dla PMR: Średnia z 30 próbek PMR wynosi 1,3 BBU/ml.

Brak neuroboreliozy	Próbki o wartościach ≤ 5 BBU/ml
Podważenie neuroboreliozy	Próbki o wartościach > 5 BBU/ml

9) CHARAKTERYSTYKA TESTU

Kryteria ważności testu:

ślepa próba	ABS musi być $\leq 0,250$
Standard ujemny	ABS musi być $\leq 0,200$ (odjęta wartość próby ślepej)
Standard cut-off	ABS musi być przynajmniej dwa razy wyższa od ABS standardu ujemnego (odjęta wartość próby ślepej)
Standard dodatni	ABS musi być przynajmniej dwa razy wyższa od ABS standardu cut-off (odjęta wartość próby ślepej)

Reakcje krzyżowe:

	n	Reakcje krzyżowe
Dodatnie w kierunku czynnika reumatoidalnego	15	1
Dodatnie w kierunku kiły	7	0

Test ten jest oparty na rekombinowanych antygenach. Nie można jednak całkowicie wykluczyć reakcji krzyżowych z próbkami dodatnimi w kierunku parametrów autoimmunologicznych.

Specyficzność & Czulość:

	Surowica	PMR/płyn mózgowo- rdzeniowy
Czulość	100%	82%
Specyficzność	96%	91%

10) PRECYZJA

Wewnątrzoznaczeniowa	Dodatnie n=12	Wysoko dodatnie n=12	Międzyoznaczeniowa	Dodatnie n=17	Wysoko dodatnie n=20
Średnia (BBU/ml)	24	38	Średnia (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
CV (%)	6,7	6,8	CV (%)	8,3	8,1

11) WSKAZÓWKI TECHNICZNE

- Nie mieszać i nie zastępować odczynników z zestawu odczynnikami z innych serii lub źródeł.
- W czasie mieszania odczynników unikać pienienia.
- Nie wymieniać korków i zakrętek od różnych odczynników. Nie używać odczynników z różnych serii.
- Nie używać odczynników po upływie daty ważności. Chronić odczynniki przed światłem słonecznym.
- Substrat powinien pozostać bezbarwny do momentu dodania do dołków.

12) UWAGI

Wszystkie składniki zestawu pochodzenia ludzkiego były testowane przeciwko anti-HIV, anti-HCV i HBsAg i zostały określone jako ujemne. Pomimo tego należy postępować z nimi jak z materiałem zakaźnym. Odczynniki płynne zawierają $\leq 0,1\%$ roztwór Procliny 300 jako środek konserwujący. Unikać kontaktu ze skórą i błonami śluzowymi. Proclin 300 nie jest toksyczny w stężeniach użytych w tym zestawie. Może wywoływać reakcję alergiczną, unikać kontaktu ze skórą lub oczami.

- Nie pipetować ustami.
- Nie jeść, nie pić, nie palić i nie używać kosmetyków, w pomieszczeniach gdzie pracuje się z zestawem.
- Unikać jakiegokolwiek kontaktu z odczynnikami poprzez używanie rękawic.
- Kwas siarkowy podrażnia oczy i skórę. W przypadku kontaktu z kwasem, miejsce kontaktu natychmiast splukać bieżącą wodą. Unikać kontaktu kwasu ze skórą i błonami śluzowymi. Możliwe wystąpienie podrażnień. W przypadku kontaktu splukać bieżącą wodą!

13) LITERATURA

Zobacz 13) *LITERATURE* w angielskiej części ulotki.

1) BEVEZETÉS

A Lyme borreliosis a spirochaete *Borrelia Burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* vagy *B. garinii*, által okozott bakteriális fertőzés, mely különböző klinikai szimptomákkal jellemezhető. 3 stádiuma van:

1. stádium: korai dermatitis, klinikai elnevezése: erythema migrans.
2. stádium: korai szóródás, klinikai elnevezése: lymphocyt meningoradiculitis (Bannwarth szindróma), neuroborreliosis.
3. stádium, késői szóródás, klinikai elnevezése: krónikus progresszív encephalomyelitis, acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), krónikus arthritis.

A diagnosztikai specificitás javítása érdekében a Biomedica vizsgálati csíkokon lévő mikrolyukakat a következő rekombináns antigénekkal vonták be:

- p21 = OspC (outer surface protein C – külső felszíni protein C): *B. afzelii* (pKo)
- p21 = OspC (outer surface protein C – külső felszíni protein C): *B. garinii* (20047)
- p41/I = (flagellin protein): *B. baviaricensis* (pBi)
- VlsE = (változókony lipoprotein): különböző *Borrelia* genospeciesek

2) A KIT TARTALMA

A mosó puffert kivéve az összes reagens használatra kész. A reageneket 2-8°C-on tároljuk.

TARTALOM	A KIT KOMPONENSEI	MENNYISÉG
PLATE	Mikrolyukakat tartalmazó csíkok, törhetőek, színekódoltak, rekombináns antigénnel bevonva	12 x 8 csík
STD	Standardok: pozitív (pos), cut-off (c.o.), negatív (neg), használatra kész	egyenként 1 x 1,5 ml
CONJ	Konjugátum: nyúl anti-humán IgG-HRPO, használatra kész	1 x 14 ml
DIL	Mintahígító zöld színezéssel, használatra kész	1 x 105 ml
SUB	Szubsztrát: TMB szubsztrát oldat, használatra kész	1 x 13 ml
WASHBUF	Mosó puffer: 20x koncentrátumú	1 x 50 ml
STOP	Stoppoló oldat: kénsav, használatra kész	1 x 10 ml

3) A KITHEZ MELLÉKELT EGYÉB ANYAGOK

- 2 öntapadó műanyag film
- Quality kontroll lap
- Protokoll lap
- Használati utasítás

4) SZÜKSÉGES, DE NEM SZÁLLÍTOTT FELSZERELÉSEK

- Precíziós pipetták 10-1000 µl –es eldobható pipettahegyekre kalibrálva
- Többcsatornás pipetta
- ELISA leolvasó az abszorbancia 450 nm-en (ill. 450 nm - 630 nm közötti értéken), történő leolvasására
- Milliméter papír vagy software az eredmények kiszámítására
- A mosáshoz lemezmosó javasolt

5) A REAGENSEK ÉS A MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE

Mintaelőkészítés:

A minta lehet szérum vagy plazma (EDTA, citrát, heparin, CPD), amelyet vérvétel után a lehető leghamarabb el kell választani az alvadéktól a hemolízis elkerülése érdekében. CSF minta szintén használható. Kerülje a minták mikrobiális szennyeződését. Az oldhatatlan anyagokat az inkubálás előtt el kell távolítani a mintából. A hő-inaktivált, ikterikus, hemolitikus, lipémiás vagy zavaros minták alkalmazása nem ajánlott.

Figyelmeztetés: Ha a vizsgálatokat nem végzik azonnal, a mintákat legfeljebb 2 hétig tárolhatjuk 2-8°C-on. A minták hosszantartó tárolása -25°C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten megengedett. A minták ismételt fagyasztása és felolvasztása nem ajánlott a pontatlan eredmények kockázata miatt. Háromnál több alkalommal nem szabad a mintát fagyasztani-felengedni.

Mintahígítás: Hígítsuk fel a humán szérumot vagy plazmát 1:101 arányban (1+100) arányban mintahígítóval (pl. 10 µl minta + 1 ml mintahígító), jól keverjük meg. Hígítsuk fel a cerebrospinalis folyadékot 1:2 arányban (1+1) mintahígítóval (pl. 100 µl minta + 100 µl mintahígító), jól keverjük meg.

Ha a minta koncentrációja > 30 BBU/ml, akkor a mintahígítóval történő további hígítás után a vizsgálat újra elvégezhető. A végső koncentráció kiszámításához, a kapott értéket szorozni kell a megfelelő hígítási faktoral.

Konjugátum: A használatra kész konjugátumot a kinyitása után 2 héten belül fel kell használni. A fel nem használt konjugátumot adagoljuk ki, majd fagyasszuk le a lejáratú idő tartamáig -25°C-ra.

A mosó puffer előkészítése: Higítsuk fel a 20-szoros koncentrátumú mosó puffert desztillált vízzel 1000 ml-re (50 ml koncentrátum + 950 ml desztillált víz). Jól keverjük meg. Az esetleg megjelenő kristályszemcsék szobahőmérsékleten feloldódnak. A hígítatlan WASHBUF mosópuffer 2-8°C fokon tárolva stabil a címkén jelzett lejáratú ideig. A kihígított mosópuffer 2-8°C fokon tárolva 1 hónapig stabil.

STD: A standardok (negatív, cut-off, pozitív) használatra készek, nem kell hígítani.

6) AZ ASSAY MŰKÖDÉSI ELVE

Lásd: Angol nyelvű használati utasítás 6. rész) *PRINCIPLE OF THE ASSAY.*

7) ASSAY PROTOKOLL

Használat előtt az összes reagensnek és mintának szobahőmérsékletűnek kell lennie (18-26°C).
Jelöljük be a protokoll lapon a vak, a standard és a minta elhelyezkedését.
Vegyük ki a mikrotiter csíkokat az alufólia zacskóból, legalább egy lyukat hagyjunk a vak számára. A fel nem használt csíkokat deszikkánssal tegyük vissza az alufólia zacskóba és tartsuk 2-8°C-on. A csíkok a címkén feltüntetett lejáratú időn belül stabilak maradnak.
Adjunk 100 µl standardot/hígított mintát a megfelelő lyukakba a vaknak kijelölt lyuk kivételével.
Fedjük be a csíkokat a műanyag filmborítóval és inkubáljuk 1 órán át 37°C-on inkubátorban.
Pipetázzunk és mossuk a lyukakat 4x legalább 250 µl hígított mosó pufferrel, majd az utolsó mosás után a lemez papírtörülköző feletti ütogetésével távolítsuk el a mosó puffer maradékát.
Adjunk 100 µl konjugátumot (anti-humán IgG-HRPO) mindegyik lyukba.
Fedjük be a csíkokat a műanyag filmborítóval és inkubáljuk 30 percig szobahőmérsékleten (18-26°C).
Pipetázzunk és mossuk a lyukakat 4x legalább 250 µl hígított mosó pufferrel, majd az utolsó mosás után a lemez papírtörülköző feletti ütogetésével távolítsuk el a mosó puffer maradékát.
Adjunk 100 µl szubsztrátot (TMB) mindegyik lyukba.
Inkubáljuk 15 percig szobahőmérsékleten (18-26°C), sötétben.
Adjunk 50 µl stoppoló oldatot mindegyik lyukba.
Azonnal mérjük meg az abszorbanciát 450 nm-en, ha lehetséges, 630 nm-es referenciával.

Automata rendszer használata lehetséges, de van, amikor ehhez módosítások szükségesek. Amennyiben segítségre van szüksége, forduljon a cég képviselőéhez.

8) AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

A vak OD értékét vonjuk le a minták és a standardok OD értékéből.

Számoljuk ki az összes minta és standard átlag OD értékét.

A cutoff standard OD értéke 10 BBU/ml -nek felel meg (BBU=Biomedica Borrelia Egység). Ez az eredmények kiszámításának az alapja.

$$\frac{\text{Ø OD of the sample}}{\text{Ø OD of the cut off control}} \times 10 = \text{BBU} / \text{ml}$$

A kitben található minőségi kontroll (QC) protokoll mutatja minden egyes kit végső kibocsátásának QC eredményét. A vásárló által kapott optikai denzitásra vonatkozó adatok eltérhetnek, az elérések különböző hatásoknak és/vagy a tárolás során normál mértékben csökkenő szignál intenzitásnak köszönhetőek. Ugyanakkor ez nem befolyásolja az eredmények validitását, amennyiben AZ ASSAY JELLEMZŐI C. 9. fejezetben leírt adatoknak megfelelő, valid eredményeket kapunk.

8.1. A szérumok/plazmák kvalitatív kiértékelése

Pozitív eredmény	A cutoff érték +10% (≥ 11 BBU/ml) fölötti OD értékű minták esetén.
Határérték	9 - 11 BBU/ml értékek közötti minták. Ezeket a betegeket új mintával ismét tesztelni kell.
Negatív eredmény	A cutoff érték -10% (≤ 9 BBU/ml) alatti OD értékű minták esetén.

8.2. A szérumok/plazmák kvantitatív kiértékelése

BBU/ml érték kiszámítása azonos a 8.1-es fejezetben leírt kvalitatív kiértékeléssel

A teszt 5 - 30 BBU/ml érték közötti lineáris. Az ezen a tartományon kívül eső értékek semi-quantitatívak.

Alternatív módon, ha a minta koncentrációja > 30 BBU/ml, akkor a mintahígítással történő további hígíthatás után a

vizsgálat újra elvégezhető. A végső koncentráció kiszámításához, a kapott értéket szorozni kell a megfelelő hígítási faktoral.

Gyenge pozitív	11 és 20 BBU/ml közötti értékelt minták
Erősen pozitív	21 és 30 BBU/ml közötti értékelt minták
Nagyon erősen pozitív	30 BBU/ml fölötti értékelt minták

8.3. A cerebrospinalis folyadék kvalitatív kiértékelése

BBU/ml érték kiszámítása azonos a 8.1-es fejezetben leírt kvalitatív kiértékeléssel.
A CSF normál értékei: 30 CSF minta átlagértéke 1,3 BBU / ml.

Neuroborreliosis negatív	A minták értéke ≤ 5 BBU/ml
Neuroborreliosis gyanús	A minták értéke > 5 BBU/ml

9) AZ ASSAY JELLEMZŐI

Valid értékek:

Vak	Az OD értéknek $\leq 0,250$ kell lennie
Negatív standard	Az OD értéknek $\leq 0,200$ kell lennie (a vak érték levonva)
Cutoff standard	Az OD értéknek a negatív standardnál legalább kétszer magasabbnak kell lennie (a vak érték levonva).
Pozitív standard	Az OD értéknek a cutoff standard OD értékénél kétszer magasabbnak kell lennie (a vak érték levonva).

Keresztreakciók:

	szám	Keresztreakciót képező
reumafaktor-pozitív	15	1
syphilis-pozitív	7	0

Ez az ELISA kit rekombináns antigéneket használ fel. Ugyanakkor az autoimmun-pozitív mintákkal történő keresztreakciókat nem lehet teljesen kizárni.

Specifitás & Szenzitivitás:

	Szérum	CSF
Szenzitivitás	100%	82%
Specifitás	96%	91%

10) PRECÍZIÓ

Intra-assay	poz. (n=12)	erősen poz. (n=12)	Inter-assay	poz. (n=17)	erősen poz. (n=20)
Átlag (BBU/ml)	24	38	Átlag (BBU/ml)	22	36
SD (BBU/ml)	2	3	SD (BBU/ml)	2	3
CV (%)	6,7	6,8	CV (%)	8,3	8,1

11) TECHNIKAI MEGJEGYZÉSEK

- Ne keverjük vagy helyettesítsük a reagenseket másik LOT-tal rendelkező kitből vagy egyéb forrásból.
- A reagensek keverése közben kerüljük a habosodást.
- Ne keverjük össze a különböző reagensek zárókupakját, fedelét, ill. ne használjuk különböző LOT-ok reagenseit.
- Ne használjuk a reagenseket a lejáratú időn túl. Övjük a reagenseket a napfénytől.
- A szubsztrát oldatnak színtelennek kell maradnia, míg hozzá nem adják a lemezhez.

12) ELŐVIGYÁZATOSSÁGOK

A teszt minden humán eredetű komponensét HIV, HCV és HBsAg antitesteket kimutató 3-ik generációs teszttel megvizsgálták, és negatívnak találták. Ugyanakkor úgy kell ezeket kezelni ill. alkalmazni, mintha fertőzőek lennének. A folyékony reagensek $\leq 0,1\%$ mennyiségben Proclin 950-at tartalmaznak tartósítószerként. Vigyázzunk, ne kerüljön bőrre vagy nyálkahártyára. A Proclin 950 a kítész használt koncentrációban nem toxikus. Allergiás bőrreakciókat okozhat, ne kerüljön a bőrre vagy a szembe.

- Ne pipettázzunk szájjal.

- Ne együnk, igyunk, ne dohányozzunk és ne használjunk kozmetikumokat azon a helyen, ahol dolgozunk.
- Kesztyű használatával kerüljük a reagensekkel való érintkezést.
- A kénsav irritálja a szemet és a bőrt. Öblítsük le vízzel, ha bőrre, szemre került. Vigyázzunk, ne kerüljön bőrre vagy nyálkahártyára. Imitációk kialakulása lehetséges – Ha bőrre vagy nyálkahártyára került, öblítsük le vízzel!

13) IRODALOM

Lásd: Angol nyelvű használati utasítás 13. rész) *LITERATURE*.

SYMBOLS



Expiry date / Verfallsdatum / Date de péremption / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Uiterste gebruiksdatum / Udløbsdato / Utgångsdatum / Termin Ważności / Lejárati idő / Doba expirácie / Doba expirace



Consider instructions for use / Bitte Gebrauchsanweisung beachten / Consultez la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de utilización / Consulte as instruções de utilização / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se brugsanvisningen / Läs anvisningarna före användning / Proszę przeczytać instrukcję wykonania / Vegyük figyelembe a használati utasításban foglaltakat / Postupujte podľa pokynov na použitie / Postupujte dle návodu k použití



In vitro Diagnostic Medical Device (for in Vitro Diagnostic Use) / In vitro Diagnostikum (zur In-vitro-Diagnostik) / Dispositif médical de diagnostic in vitro (Pour usage diagnostique in vitro) / Dispositivo médico per diagnostica in vitro (per uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (para uso diagnóstico in vitro) / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro (Para utilização de diagnóstico "in vitro") / Medisch hulpmiddel voor diagnostiek in vitro (Voor diagnostisch gebruik in vitro) / Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik (Udelukkende til in vitro diagnostisk anvendelse) / Medicinteknisk produkt avsedd för in vitro-diagnostik (För in vitro-diagnostiskt bruk) / Wyrób medyczny do Diagnostyki In Vitro / In vitro orvosdiagnosztikai termék / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určené pre diagnostiku „in vitro“) / In vitro diagnostický zdravotnický materiál (určeno pro diagnostiku „in vitro“)



Lot-Batch Number / Charge-Chargennummer / Lot-Code du lot / Lotto-Numero di lotto / Lote-Código de lote / Lote-Código do lote / Lot-Partijnummer / Lot-Batchkode / Lot-Satskod / Numer serii / Lot-Batch szám / Číslo šarže / Číslo šarže



Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por / Vervaardigd door / Fabrikation af / Tillverkad av / Wyprodukowane pr / Gyártotta / Vyrobené / Vyrobeno



Catalogue Number / Bestellnummer / Numéro de référence / Numero di riferimento / Número de referencia / Número de referência / Referentienummer / Referencenumber / Katalognummer / Numer katalogowy / Katalógusszám / Katalógové číslo / Katalógové číslo



Store at between / Lagerung bei zwischen / Conserver à entre / Conservare a tra / Conservar a temp. entre / Armazene a entre / Bewaar bij tussen / Opbevares mellem / Förvaras vid / Przechowywać w / Tároljuk között / Skladujte v rozsahu / Skladujte v mezii



Contains sufficient for x tests / Inhalt ausreichend für x Tests / Contient suffisant pour x tests / Contenido suficiente per x test / Contiene suficiente para x pruebas / Contém suficiente para x testes / Bevat voldoende voor x bepalingen / Indeholder tilstrækkeligt til x prøver / Innehåller räcker till x analyser / Zawartość na x testów / Tartalma X teszt elvégzésére elegendő / Obsahuje materiál pre x testov / Obsahuje materiál pro x testů

BI-21042 ANTI BORRELIA IgM

ASSAY PROTOCOL AND CHECKLIST

- Bring all reagents to room temperature (18-26°C).
- Prepare reagents and samples as instructed.
- Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- Take microtiter strips out of the alu bag and mark positions on the protocol sheet.

- 1. Add 100 µl STD/SAMPLE (standard/ diluted sample) into each well, except blank.
- 2. Cover tightly and incubate for 1 hour at 37°C.**
- 3. Aspirate and wash wells with at least 250 µl WASHBUF (Wash buffer) four times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- 4. Add 100 µl CONJ (Conjugate) into each well.
- 5. Cover tightly and incubate for 30 minutes at room temperature (18-26°C).**
- 6. Aspirate and wash wells with at least 250 µl WASHBUF (Wash buffer) four times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- 7. Add 100 µl SUB (Substrate) into each well.
- 8. Incubate for 15 minutes at room temperature (18-26°C), in the dark.**
- 9. Add 50 µl STOP (Stop solution) into each well. Swirl gently.
- 10. Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.