

Návod pro použití

EIA Borrelia recombinant IgM (192)

REF BrM192



Souprava pro profesionální použití



 **TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**
Křížíkova 68, 612 00 Brno, Czech Republic
Tel.: +420 541 248 311
FAX: +420 541 243 390
E-mail: info@testlinecd.com
www.testlinecd.cz
www.testlinecd.com

OBSAH

1	Určený účel použití.....	3
2	Úvod	3
3	Princip testu.....	4
4	Složení soupravy	5
5	Další potřebné vybavení k manuálnímu provedení testu.....	6
6	Skladování a expirace soupravy	6
7	Příprava pracovních roztoků.....	6
8	Ředění vzorků	7
9	Pracovní postup	7
10	Pracovní schéma	9
11	Validita testu.....	10
12	Hodnocení výsledků	10
13	Charakteristiky soupravy.....	12
14	Bezpečnost práce	14
15	Technické připomínky	15
16	Průkaz intratekální syntézy specifických protilátek	16
17	Reference.....	22
18	Vysvětlení symbolů	23

1 Určený účel použití

Imunoenzymatická souprava slouží ke stanovení protilátek IgM proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v lidském séru, plazmě, mozkomíšním moku nebo synoviální tekutině a k průkazu intratekální syntézy specifických protilátek.

2 Úvod

Lymeská borrelióza (LB) je multisystémové infekční onemocnění vyvolané spirochetou *Borrelia burgdorferi*. Infekce je přenášena klíšťaty rodu *Ixodes*.

Klinické projevy Lymeské borreliózy rozlišujeme na časně a pozdní.

- Časná lokalizovaná fáze – trvá řádově dny až týdny. Charakteristickým projevem je erythema migrans (EM), které se vytváří pouze v 50 % případů. Nemoc se většinou na počátku projevuje chřipkovými příznaky, bolestmi hlavy, lymfadenitidou.
- Časná diseminovaná fáze – trvá přibližně týdny až měsíce. Dochází k hematogenní a lymfogenní diseminaci borrelií (CNS, klouby, srdce, oko, kůže-sekundární EM). V této fázi jsou nejčastěji diagnostikovány neuroborrelióza, paresa neurofacialis, borreliový lymfocytom (vytváří se na ušních lalůčkách, kloubech prstů) a Bannwarthův syndrom.
- Pozdní diseminovaná fáze – trvá měsíce až roky. Nastávají imunopatologické změny. Diagnosticky typické jsou acrodermatitis chronica atrophicans (chronická kožní léze-ACA), chronická neuroborrelióza, borreliová artritida.

Výsledky četných studií ukazují, že všechna genospecies se podílejí nejen na vzniku EM, ale také na celé šíři klinických manifestací. Avšak četnost izolací naznačuje, že *B. burgdorferi* sensu stricto má převážně vztah ke kloubním postižením, *B. garinii* je spojována s neurologickými symptomy a *B. afzelii* s chronickými kožními projevy, zejména ACA.

Diagnostika onemocnění je založena na klinickém obraze, anamnéze a laboratorních testech. V současné době je nejvhodnější diagnostickou metodou screeningové stanovení hladiny specifických protilátek třídy IgG a IgM metodou ELISA a následná confirmace přítomnosti protilátek proti specifickým antigenům pomocí metody imunoblot. Přímý kultivační nebo elektronoptický průkaz není vhodný pro rutinní praxi.

Sérologická diagnostika borreliózy je složitá vzhledem k různým faktorům, jako je velká genetická diverzita druhu *Borrelia burgdorferi* s.l., možná zkřížená reaktivita s nepříbuznými antigeny jiných mikroorganismů, bohatost borrelií na heat shock proteiny. Diagnostiku komplikují rovněž velké rozdíly sérologické reaktivity různých jedinců. Tvorba protilátek v časně fázi může být extrémně pomalá. Na druhé straně IgG i IgM protilátky mohou přetrvávat deset i více let.

EIA *Borrelia* recombinant je enzymoimunoanalytická souprava III. generace s vysokou diagnostickou citlivostí a specifitou, vhodná pro screeningové stanovení antiborreliových protilátek včetně průkazu intratekální syntézy u pacientů se suspektní neuroborreliózou.

3 Princip testu

Souprava umožňuje detekci specifických protilátek třídy IgM ve vzorku metodou EIA, typ sandwich (tj. pevná fáze s navázaným specifickým antigenem – protilátka z vyšetřovaného vzorku - značená protilátka). Značená protilátka (konjugát) je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgM konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, který zmodrá v případě positivity. Celá reakce je ukončena zastavovacím roztokem. Dojde ke změně modrého zabarvení na žluté. Intenzita žlutého zabarvení se měří na fotometru (při vlnové délce 450 nm) a je úměrná koncentraci specifických IgM protilátek přítomných ve vzorku.

Použitý antigen

Kombinace rekombinantních antigenů OspC (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*), VlsE, interního flagelinu p41i, p39, p17 a OspE druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato

4 Složení soupravy

MICROPLATE		Potažená destička	2 ks	
		s navázaným antigenem, 12 x 8 jamek v sáčku se sušidlem		
CONTROL	-	CAL1	Negativní kontrola (Kalibrátor 1) 5 U/ml	1 × 2 ml
			Roztok neobsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění	
CUTOFF		CAL2	CUT-OFF (Kalibrátor 2) 20 U/ml	1 × 3 ml
			Roztok obsahující specifické lidské protilátky v hraniční koncentraci, v pracovním ředění	
CONTROL	+	CAL3	Pozitivní kontrola (Kalibrátor 3) 200 U/ml	1 × 2 ml
			Roztok obsahující specifické lidské protilátky, v pracovním ředění	
CONJUGATE			Konjugát	1 × 28 ml
			Roztok obsahující zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgM značený peroxidázou, v pracovním ředění	
DILUENT 2			Ředicí roztok vzorků 2	1 × 105 ml
			Pufr se stabilizátory bílkovin, v pracovním ředění	
SUBSTRATE 2			TMB-Complete 2	1 × 28 ml
			Jednosložkový substrátový roztok obsahující TMB/H ₂ O ₂ , v pracovním ředění	
WASH 20x			Promývací roztok	2 × 75 ml
			20krát koncentrovaný pufr	
STOP			Zastavovací roztok	1 × 28 ml
			Roztok kyseliny, v pracovním ředění	
			Pracovní návod	1 ks

5 Další potřebné vybavení k manuálnímu provedení testu

Jedno a vícekanálové pipety

Špičky pro jednorázové použití

Promývací zařízení

Stopky

Termostat na 37 °C

Fotometr pro mikrotitrační destičky

6 Skladování a expirace soupravy

Soupravu skladujte při teplotě +2 °C až +8 °C. Při dodržení skladovacích podmínek platí expirace uvedená na obalu soupravy. Po otevření je doporučeno soupravu spotřebovat do 3 měsíců. Souprava nesmí zmrznout!

Vzorky a jejich skladování

Jako vzorek k vyšetření může být použito lidské sérum, citrátová plazma, mozkomíšni mok a synoviální tekutina. Vzorky bakteriálně kontaminované, hemolytické nebo chylózní a antikoagulanty obsažené v plazmě (s výjimkou citrátu) mohou ovlivnit výsledek testu.

Vyšetřované vzorky je možno uchovávat při +2 °C až +8 °C maximálně 1 týden. Při delším skladování vzorky zmrazte na -20°C. Naředěné vzorky je nutno vyšetřit co nejdříve.

7 Příprava pracovních roztoků

Promývací roztok ředte 1:20 (1 díl roztoku a 19 dílů destilované vody). Např. 75 ml koncentrovaného Promývacího roztoku + 1425 ml destilované vody.

V lahvičce s Promývacím roztokem se mohou vytvořit krystaly solí. Tyto krystaly je třeba před použitím rozpustit zahřátím na vodní lázni. Roztok po naředění je stabilní jeden týden při +2 °C až +8 °C.

Kontroly (pozitivní, negativní a CUT-OFF) jsou v pracovním ředění, dále neředit!

Konjugát je v pracovním ředění, dále neředit!

TMB-Complete je jednosložkový chromogenní substrátový roztok v pracovním ředění, dále neředit!

Zaměnitelnost roztoků

Ředicí roztok vzorků, TMB-Complete a Aviditní roztok jsou v EIA soupravách TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. zaměnitelné, pokud mají stejné číselné označení (např. Ředicí roztok vzorků 2, Ředicí roztok vzorků 3, atd.). Zastavovací a Promývací roztok je univerzální ve všech soupravách.

8 Ředění vzorků

Ředící roztok vzorků před použitím šetrně promíchejte.

Ředění vzorků sér a plazem

Důkladně promíchané vzorky ředte 1:101 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 10 µl vzorku + 1 ml Ředícího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

Ředění vzorků mozkomíšního moku (likvoru)

Důkladně promíchané likvory ředte 1:2 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 110 µl likvoru + 110 µl Ředícího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

Ředění vzorků synoviální tekutiny

Důkladně promíchané synoviální tekutiny ředte 1:21 a 1:41 Ředícím roztokem vzorků:

např.: 20 µl tekutiny + 400 µl Ředícího roztoku vzorků a

10 µl tekutiny + 400 µl Ředícího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

9 Pracovní postup

Všechny reagenty nechte vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchejte. Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

1. Dávkujte kontroly (kalibrátory) a ředěné vzorky podle pracovního schématu.

Semikvantitativní vyhodnocení v indexu positivity (IP)

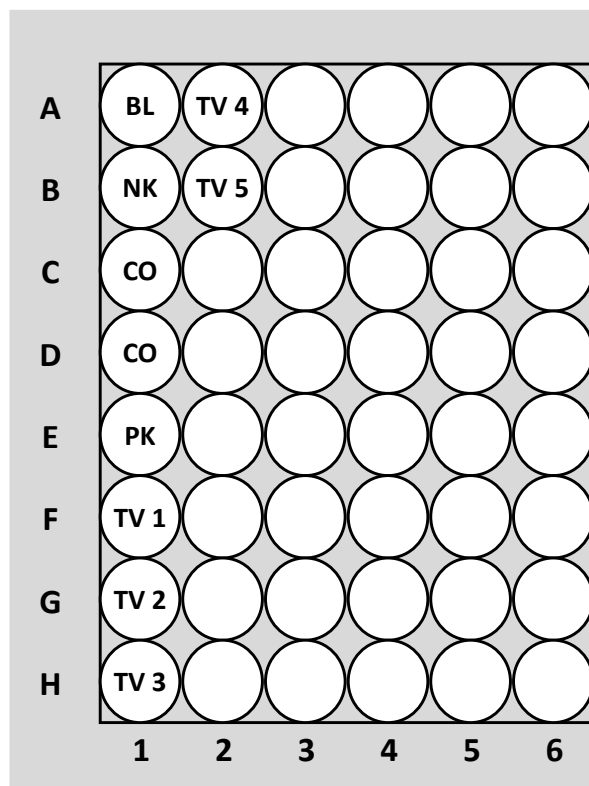
- Jamku A1 ponechte prázdnou (blank).
- Pipetujte 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky.
- Pipetujte 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek.
- Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 1 jamky.
- Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění (viz kapitola Ředění vzorků) do zbývajících jamek.

Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách U/ml

- Jamku A1 ponechte prázdnou (blank).
 - Pipetujte 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky.
 - Pipetujte 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek.
 - Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 2 jamek.
 - Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění (viz kapitola Ředění vzorků) do zbývajících jamek.
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
 3. Odsajte obsah jamek a 5 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
 4. Dávkujte do všech jamek kromě A1 100 µl Konjugátu.
 5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
 6. Odsajte obsah jamek a 5 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
 7. Dávkujte do všech jamek 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečištění – viz kapitola Technické připomínky.
 8. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 15 minut při 37 °C v temnu.
 9. Zastavte reakci přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
 10. Změřte na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku (jamka A1), a to do 30 minut po zastavení reakce.

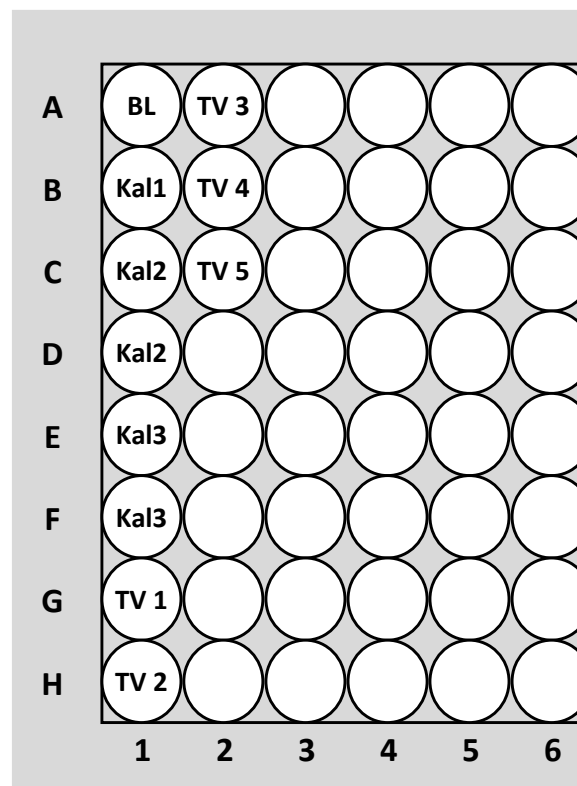
10 Pracovní schéma

semikvantitativní vyhodnocení
v indexu pozitivity (IP)



BL	Blank (prázdná jamka)			
NK	100 µl	CONTROL	-	CAL1
CO	100 µl	CUTOFF	CAL2	
PK	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	Ředěného testovaného vzorku		

kvantitativní vyhodnocení
v jednotkách U/ml



BL	Blank (prázdná jamka)			
Kal1	100 µl	CONTROL	-	CAL1
Kal2	100 µl	CUTOFF	CAL2	
Kal3	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	ředěného testovaného vzorku		

11 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Absorbance blanku je menší než 0,150.

$$\text{BLANK} < 0,150$$

Absorbance Negativní kontroly (Kalibrátor 1) je menší než polovina průměru absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2).

$$\text{CONTROL} - \text{CAL1} < 0,5 \times \text{CUTOFF} \text{ CAL2}$$

Průměrná absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2) je v rozmezí 0,150 – 0,900.

$$0,150 < \text{CUTOFF} \text{ CAL2} < 0,900$$

Absorbance Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) je větší než 1,5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2).

$$\text{CONTROL} + \text{CAL3} > 1,5 \times \text{CUTOFF} \text{ CAL2}$$

12 Hodnocení výsledků

Výpočet Indexu positivity (IP)

Dělte absorbanci testovaného vzorku průměrnou absorbancí CUT-OFF naměřenou v téže sérii vyšetření:

$$\text{IP} = \frac{\text{Absorbance séra, plazmy, moku, synoviální tekutiny}}{\text{Průměrná absorbance CUT-OFF}}$$

Interpretace výsledků vyšetření uvádějí tabulky (Tabulka 1 a Tabulka 2).

Tabulka 1 Interpretace výsledků vyšetření sér, plazem a moků

Index positivity (IP)	Hodnocení
menší než 0,9	negativní
0,9 až 1,1	hraniční
větší než 1,1	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků, tj. s indexem positivity 0,9 až 1,1 je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů v závislosti na druhu onemocnění.

Tabulka 2 Interpretace výsledků vyšetření synoviální tekutiny

Vzorek	Ředění vzorku 1:21	Ředění vzorku 1:41	Celkové hodnocení
	IP	IP	
vzorek X	menší než 1,0	menší než 1,0	negativní
vzorek Y	větší než 1,0	menší než 1,0	hraniční
vzorek Z	větší než 1,0	větší než 1,0	pozitivní

Interpretace vyšetření je založena na porovnání IP dosažených při dvou různých ředěních vzorku.

Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách (U/ml)

Sestrojte kalibrační křivku tak, že na osu X vynesete koncentrace kalibrátorů v U/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Propojením jednotlivých bodů vytvořte kalibrační křivku. Hladinu protilátek ve vzorcích (U/ml) stanovte odečtením těchto hodnot z kalibrační křivky. Interpretace výsledků kvantitativního vyhodnocení testu uvádí tabulka (Tabulka 3).

Tabulka 3 Kvantitativní interpretace výsledků vyšetření sér, plazem a moků v jednotkách (U/ml)

Hladina protilátek (U/ml)	Hodnocení
menší než 18	negativní
18 až 22	hraniční
větší než 22	pozitivní

Vyšetření hraničních vzorků je zapotřebí opakovat z nového odběru za 2 až 6 týdnů s ohledem na specifika daného onemocnění.

Sérologický nálezn je možno interpretovat pouze v kontextu s výsledky ostatních laboratorních testů a s klinickým obrazem pacienta.

Stanovení intratekální syntézy pomocí Antibody indexu

Stanovení Antibody indexu je uvedeno v kapitole Stanovení intratekální syntézy specifických protilátek.

13 Charakteristiky soupravy

13.1 Specifita a citlivost

Diagnostická specifita byla stanovena na panelu negativních sér. Diagnostická citlivost byla stanovena na panelu pozitivních sér. Počet testovaných sér a získané výsledky jsou popsány v tabulce (Tabulka 4).

13.2 Opakovatelnost

Referenční kontrolní vzorky byly testovány ve statisticky významném počtu replikací, a to buď v jedné, nebo v několika analýzách. Získaná data byla použita pro Intra- a Inter-assay stanovení. Získané výsledky jsou popsány v tabulce (Tabulka 4).

13.3 Analytická citlivost – mezní práh citlivosti

Je to maximální ředění hraničního nebo slabě pozitivního vzorku, eventuálně mezinárodně uznávaných standardů, při kterém se ještě mění absorbance. Je vyjádřena v jednotkách U/ml. Tato hodnota představuje minimální mez detekce a kvantifikace. Získané výsledky jsou popsány v tabulce (Tabulka 4).

13.4 Intrahomogenita

Vyjadřuje stupeň shody výsledků mezi 100 replikací hraničního nebo slabě pozitivního vzorku v jedné sérii vyšetření. Je vyjádřena pomocí variačního koeficientu. Získané výsledky jsou popsány v tabulce (Tabulka 4).

13.5 Rozsah měření soupravy

Rozsah měření každé soupravy leží mezi hodnotami nejnižšího a nejvyššího kalibrátoru.

Tabulka 4 Charakteristika soupravy

Parametr	Hodnota
Specifita (n 124)	97,72 %
Citlivost (n 114)	99,07 %
Intra-assay	33,43 %
Inter-assay	6,42 %
Analytická citlivost – index pozitivity (IP)	0,07
Intrahomogenita	3,64 %

13.6 Interference

Dva vzorky (jeden mix negativních plazem a jeden mix pozitivních plazem) byly obohaceny potenciálně interferujícími endogenními látkami. Výsledky stanovení interference uvádí tabulka (Tabulka 5).

Tabulka 5 Výsledky interference

Interferující látka	Výsledek neovlivněn do koncentrace:
Bilirubin	0,4 mg/ml
Triacylglyceroly	20 mg/ml
Hemoglobin	5 mg/ml

13.7 Zkřížená reaktivita

Na soupravě byly vyšetřeny vzorky pozitivní pro vybrané potenciálně zkříženě reagující patogeny nebo faktory. Výsledky testu shrnuje tabulka (Tabulka 6).

Tabulka 6 Výsledky zkříženě reagujících patogenů nebo faktorů

Kategorie	n	Pozitivní výsledek
<i>Treponema pallidum</i>	15	0
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	8	0
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	13	0
Virus klíšťové encefalitidy	8	0
RF	13	0
ANA	19	0
EBV	9	0
Celkem	85	0

14 Bezpečnost práce

Souprava je určena pouze pro diagnostické účely in vitro.

Séra použitá při výrobě kontrol byla vyšetřena na HIV 1 a HIV 2, HBsAg, HCV, TPHA s negativním výsledkem. Přesto je třeba s nimi pracovat jako s potenciálně infekčním materiálem.

Některé reagenty obsahují toxickou složku azid sodný. Vyvarujte se kontaktu s kůží. Zastavovací roztok obsahuje zředěný roztok kyseliny. Při práci s tímto roztokem chraňte oči a pokožku!

Je nutné dodržovat místní předpisy týkající se bezpečnosti práce.

První pomoc

Při zasažení očí vymývejte velkým množstvím vlažné vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Při zasažení oděvu a kůže odložte veškeré kontaminované oblečení. Pokožku omyjte velkým množstvím vody a mýdlem. Při potřísnění roztokem, který obsahuje plazmu nebo klinický vzorek, pokožku dezinfikujte. Při náhodném požití vypláchněte ústa pitnou vodou a vyhledejte lékařskou pomoc.

Likvidace zbytků po provedení testů

Veškeré pomůcky použité k provedení testu je nutné považovat vzhledem ke kontaktu s biologickým materiálem za potenciálně infekční. Proto je likvidujte společně s biologickým odpadem.

Likvidace soupravy po expiraci

Soupravu rozeberte na jednotlivé komponenty a zlikvidujte je jako biologický materiál. Obaly a zbytky obalů likvidujte jako tříděný odpad podle místních předpisů.

15 Technické připomínky

Pro získání spolehlivých výsledků je nutné **přesné dodržování návodu**. Při práci používejte vždy pomůcky nejvyšší čistoty. Dávejte přednost jednorázovým pomůckám.

Mikrotitrační destička – před otevřením nechejte vždy sáček s mikrotitrační destičkou vytemperovat na laboratorní teplotu, aby nedošlo ke kondenzaci vodních par na povrchu destičky.

Promývací roztok – pro přípravu promývacího roztoku v pracovním ředění používejte vysoce kvalitní destilovanou vodu.

Promývání – dodržujte předepsaný počet promývacích cyklů a jamky plňte vždy až po horní okraj. Doba, po kterou zůstávají jamky naplněny promývacím roztokem mezi promývacími cykly (soak time), by měla být asi 30-60 sekund.

TMB-Complete – pipetovací vaničku pro TMB-Complete nepoužívejte pro jiné roztoky. Zbytek roztoku z pipetovací vaničky nevracejte zpět do lahvičky.

Nereprodukovatelné výsledky mohou pocházet z metodických chyb, zejména:

- nedostatečné promíchání roztoků a vzorků před použitím
- záměna uzávěrů lahviček
- použití stejné špičky při pipetování různých roztoků
- vystavení reagensů nadměrné teplotě, bakteriální nebo chemické kontaminaci
- nedostatečné promytí jamek, neplnění jamek až po okraj, špatné odsátí zbytků roztoku
- znečištění okrajů jamek konjugátem nebo vzorky
- záměna reagensů z různých šarží souprav
- kontakt reagensů s oxidanty, těžkými kovy a jejich solemi.

Soupravu je možno zpracovávat postupně. Pro přípravu pracovních roztoků odeberte jen takové množství reagensů, které bude spotřebováno pro analýzu.

Soupravu je možno zpracovat na všech typech automatických ELISA analyzátorů. V případě potřeby TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. nabízí certifikovanou modifikaci pracovního návodu pro konkrétní typ analyzátoru.

Produkt chráněn evropskými patenty č. 0894143 a č. 1012181.

Při nedodržení pracovního postupu výrobce neodpovídá za správnou funkci soupravy.

16 Průkaz intratekální syntézy specifických protilátek

16.1 Úvod

Průkaz intratekální produkce protilátek je dle mezinárodního doporučení (EFNS guidelines) nezbytný pro diagnostiku časně i pozdní neuroborreliózy. Samotný průkaz zvýšených protilátek v séru není dostatečný. Diagnostika neuroborreliózy spočívá v detekci hladiny specifických antiborreliových protilátek vytvářených v likvoru. K tomuto se využívá stanovení specifického protilátkového indexu – Antibody indexu (AI). Hlavním významem Antibody indexu je možnost potvrzení intratekální syntézy specifických protilátek v mozkomíšním moku.

16.2 Princip testu

Antibody index vyjadřuje poměr hladiny protilátek v mozkomíšním moku (likvoru) k výši hladiny protilátek v krevním séru ve vztahu ke stavu hematolikvorové bariéry a koncentraci celkových imunoglobulinů v likvoru a séru.

K výpočtu stačí hodnoty kontrol z EIA testu. Z nich program Antibody Index Software firmy Testline Clinical Diagnostics s.r.o. sestrojí kalibrační křivku, ze které se určují příslušné arbitrární jednotky testovaného vzorku a následně počítá Antibody index.

16.3 Materiál k provedení testu

Pro stanovení Antibody indexu potřebujete současně odebrané vzorky likvoru a séra (plazmy).

16.4 Podklady a vybavení k vyhodnocení Antibody indexu

K vyhodnocení testu potřebujete:

1. Hodnoty koncentrace albuminu a celkových imunoglobulinů IgM v likvoru a séru. Stanovení se provádí např. nefelometricky. Poměr koncentrací albuminu v likvoru a séru (plazmě) vyjadřuje stav hematolikvorové bariéry.
2. Program Antibody Index Software.

16.5 Ředění vzorků likvorů a sér

Postupujte stejně jako při stanovení hladiny specifických protilátek (viz kapitola Ředění vzorků).

Další ředění vzorků likvorů a sér

Provádí se pouze v případě, že absorbance buď jen likvoru, nebo jak likvoru, tak zároveň i séra, přesahují absorbanci nejvyššího bodu kalibrační křivky a výsledek AI u takového párového vzorku je negativní.

Naředěné vzorky likvorů a sér (viz kapitola Ředění vzorků) dále ředíte 1:10 Ředicím roztokem vzorků:

např.: 15 µl naředěného vzorku séra + 135 µl Ředicího roztoku vzorků a

15 µl naředěného vzorku likvoru + 135 µl Ředicího roztoku vzorků.

Dobře promíchejte.

16.6 Pracovní postup

Všechny reagentie nechte vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promíchejte. Nepoužijete-li celou destičku, zbylé stripy vraťte zpět do obalu se sušidlem, hermeticky uzavřete a skladujte při +2 °C až +8 °C. Důsledně chraňte před vlhkostí!

Provedení testu pro stanovení Antibody indexu je identické jako u běžného testování vzorků.

1. Dávkujte kontroly (kalibrátory) a ředěné vzorky podle pracovního schématu.

Semikvantitativní vyhodnocení v indexu pozitivity (IP)

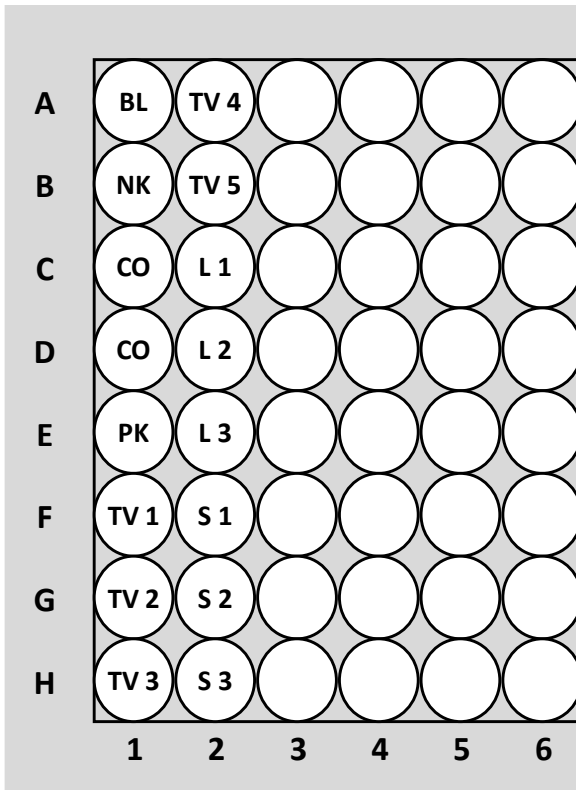
- Jamku A1 ponechte prázdnou (blank).
- Pipetujte 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky.
- Pipetujte 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek.
- Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 1 jamky.
- Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
- Pipetujte 100 µl vzorků (likvor, sérum) v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.

Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách U/ml

- Jamku A1 ponechte prázdnou (blank).
 - Pipetujte 100 µl Negativní kontroly (Kalibrátor 1) do 1 jamky.
 - Pipetujte 100 µl CUT-OFF (Kalibrátor 2) do 2 jamek.
 - Pipetujte 100 µl Pozitivní kontroly (Kalibrátor 3) do 2 jamek.
 - Pipetujte 100 µl vzorků v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
 - Pipetujte 100 µl vzorků (likvor, sérum) v odpovídajícím ředění do zbývajících jamek.
2. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
 3. Odsajte obsah jamek a 5 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
 4. Dávkujte do všech jamek kromě A1 100 µl Konjugátu.
 5. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 30 minut při 37 °C.
 6. Odsajte obsah jamek a 5 krát promyjte pracovním promývacím roztokem. Jamky plňte po horní okraj. Na závěr důkladně vyklepejte zbytky roztoku do svého materiálu.
 7. Dávkujte do všech jamek 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete. Pozor na znečištění – viz kapitola Technické připomínky.
 8. Destičku přikryjte víčkem a inkubujte 15 minut při 37 °C v temnu.
 9. Zastavte reakci přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí a intervalech jako byl dávkován substrát.
 10. Změřte na fotometru při vlnové délce 450 nm intenzitu zbarvení roztoků v jamkách proti blanku (jamka A1), a to do 30 minut po zastavení reakce.

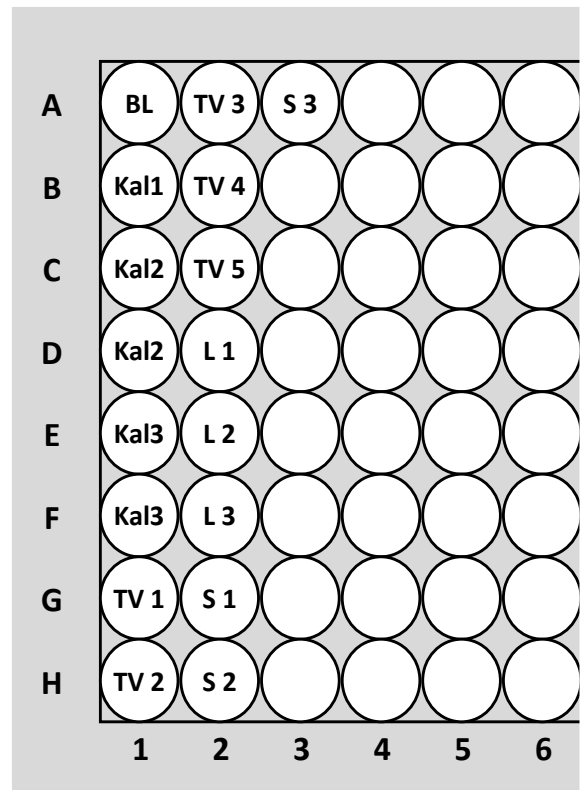
16.7 Pracovní schéma

semikvantitativní vyhodnocení
v indexu pozitivity (IP)



BL	Blank (prázdná jamka)			
NK	100 µl	CONTROL	-	CAL1
CO	100 µl	CUTOFF	CAL2	
PK	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	ředěného testovaného vzorku		
L 1-x	100 µl	ředěného vzorku likvoru		
S 1-x	100 µl	ředěného vzorku séra		

kvantitativní vyhodnocení
v jednotkách U/ml



BL	Blank (prázdná jamka)			
Kal1	100 µl	CONTROL	-	CAL1
Kal2	100 µl	CUTOFF	CAL2	
Kal3	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	ředěného testovaného vzorku		
L 1-x	100 µl	ředěného vzorku likvoru		
S 1-x	100 µl	ředěného vzorku séra		

16.8 Validita testu

Test je platný, jestliže:

Absorbance blanku je menší než 0,150.

$$\text{BLANK} < 0,150$$

Průměrná absorbance CUT-OFF (Kalibrátor 2) je v rozmezí 0,350 – 0,750.

$$0,350 < \boxed{\text{CUTOFF}} \boxed{\text{CAL2}} < 0,750$$

16.9 Hodnocení výsledků

Stanovení Antibody indexu (AI)

Pro stanovení intratekální syntézy použijte program Antibody Index Software firmy TestLine s r.o. a postupujte dle návodu programu.

Interpretace výsledků vyšetření uvádí tabulka (Tabulka 7).

Tabulka 7 Interpretace výsledků vyšetření

Hodnota AI	Interpretace výsledků
< 1,4	negativní AI, intratekální syntéza neprokázána
1,4 - 1,5	hraniční AI, výsledek nutno hodnotit v korelaci s trváním klinického nálezu a protilátkovou odpovědí v séru
> 1,5	pozitivní AI, intratekální syntéza prokázána

Ve výjimečných případech může dojít k tomu, že absorbance buď jen likvoru, nebo jak likvoru, tak zároveň i séra, přesahují absorbanci nejvyššího bodu kalibrační křivky a přitom výsledek AI u takového párového vzorku je negativní. Program vás ve svém hodnocení na tuto skutečnost upozorní. Pak nařaděné vzorky likvoru a séra dále ředte Ředicím roztokem pro vzorky (viz Další ředění vzorků likvorů a sér; Ředění vzorků).

Poznámky k interpretaci výsledků

S ohledem na imunologickou reaktivitu organismu na borreliové antigeny je nezbytné brát v úvahu:

- pomalou tvorbu protilátek v časném stadiu onemocnění,
- možnost ovlivnění tvorby protilátek předchozí aplikací antibiotik,
- netypickou dynamiku protilátkové odpovědi,
- přetrvávání protilátek po terapii nemusí znamenat selhání léčby,
- seronegativitu u malého procenta nemocných,
- negativní nález v likvoru nevylučuje lymeskou neuroborreliózu.

Hladiny protilátek v mozkomíšním moku závisí na následujících parametrech:

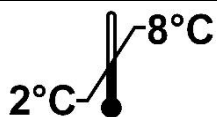
- hladina protilátek v krevním séru,
- permeabilita hematolikorové bariéry,
- intratekální produkce protilátek.

Specifické imunoglobuliny se mohou intratekálně tvořit i po dobu několika let po antibiotické léčbě. V některých případech specifické protilátky mohou být detekovány v likvoru dříve než v séru.

17 Reference

1. Embers ME, Hasenkampf NR, Bames MB, Didier ES, Philipp MT, Tardo AC, Five-antigen fluorescent bead-based assay for diagnosis of Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol.* 2016, 23(4), 294-303.
2. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC, Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2001, 33(6), 780-785.
3. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC, Cross-Reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis.* 1987, 156(1), 183-188.
4. Marques AR, Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am.* 2015, 29(2), 295-307.
5. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, Fingerle V, Huppertz HI, Hunfeld KP, Krause A, Ruf B, Dersch R, Consensus group, Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci.* 2020, 18, 1-29.
6. Reiber H, Lange P, Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem.* 1991, 37(7), 1153-1160.
7. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J, Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17(1), 69-79.
8. Steere AC, Lyme disease. *N. Engl J Med.* 2001, 345, 115-125.
9. Trevejo RT, Krause PJ, Sikand VK, Schriefer ME, Ryan R, Lepore T, Porter W, Dennis DT, Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. *J Infect Dis.* 1999, 179(4), 931-938.
10. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J, Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis.* 1993, 17(4), 708-717.
11. Wilske B., Zöller L., Brade V., Eiffert H., Göbel U.B., Stanek G. in cooperation with Pfister H.-W.; MiQ 12 2000 Lyme Borreliosis, *Microbiological diagnosis*
12. Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ, Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell.* 1997, 89(2), 275-285.

18 Vysvětlení symbolů



Skladovací teplota



Udržovat v suchu



Použít do data



Číslo šarže



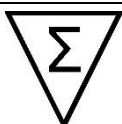
Výrobce



Čtěte návod k použití



Katalogové číslo














Počet testů



Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro

Schéma testu EIA *Borrelia recombinant IgM* (192)

Krok	Symbol	Jednotlivé kroky testu
1		Ředění vzorků séra/plazmy 1:101 (10 µl + 1 ml) mozkomíšní moky 1:2 (110 µl + 110 µl) synoviální tekutiny 1:21 (20 µl + 400 µl), 1:41 (10 µl + 400 µl)
2		Dávkování kontrol a ředěných vzorků 100 µl Blank = prázdná jamka
3		Inkubace 30 min při 37 °C
4		Odsátí a promytí jamek 5 krát
5		Dávkování Konjugátu 100 µl Blank = prázdná jamka
6		Inkubace 30 min při 37 °C
7		Odsátí a promytí jamek 5 krát
8		Dávkování substrátu (TMB-Complete) 100 µl Včetně blanku
9		Inkubace 15 min při 37 °C
10		Dávkování Zastavovacího roztoku 100 µl Včetně blanku
11		Fotometrické měření při 450 nm