

VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)

Nr. comandă: WE222G32; WE222G96

VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)

Nr. comandă: WE222M32; WE222M96

VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)

Nr. comandă: WE223G32; WE223G96

NUMAI PENTRU DIAGNOSTICAREA IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim
Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-82621
www.virotechdiagnostics.com



Freigabedatum: 20.6.2018

REV 9 / VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot RO

Cuprins

1. Domeniul de utilizare	3
2. Principiul testului	3
3. Conținutul pachetului	3
3.1 Kit pentru 32 de determinări	3
3.2 Kit pentru 96 de determinări	3
4. Depozitare și stabilitate	4
5. Precauții și atenționări	4
6. Materiale necesare suplimentar (nu se livrează)	4
7. Materialul de examinare	5
8. Efectuarea testării	5
8.1 Pregătirea probelor	5
8.2 Pregătirea reactivilor	5
8.3 Procedura testului Immunoblot	5
8.4 Utilizarea procesoarelor pentru Immunoblot	6
9. Interpretarea rezultatelor	6
9.1 Interpretarea probelor pacienților	7
9.2 Utilizarea matorului de întrerupere (Cut off)	7
9.3 Semnificația antigenelor	7
9.4 Criterii de interpretare	9
9.5 Limitele testului	11
10. Referințe	11
11. Simboluri	13
12. Schema procedurii de testare	14

1. Domeniul de utilizare

Kit de testare LINE Immunoblot pentru identificarea calitativă a anticorpilor IgG, respectiv IgM specifici pentru **B. burgdorferi** în sens larg, din serul uman.

Pe lângă utilizarea sa la sero-diagnosticarea boreliozei Lyme, IgG Line Immunoblot este de asemenea adecvat pentru diagnosticarea neuro-boreliozei în lichidul cerebrospinal. Vă rugăm comanda instrucțiuni separate pentru utilizare la sero-diagnostic.

2. Principiul testului

Antigenele patogene sunt transferate pe o membrană de nitroceluloză folosind un procedeu special de pulverizare. Membrana de nitroceluloză este tăiată apoi în stripuri individuale.

Incubarea stripurilor de nitroceluloză purtătoare de antigen cu probe de ser / plasmă umană permite detectarea anticorpilor specifici existenți. Acești anticorpi formează imuno-complexe cu antigenul fixat pe fața test. După îndepărtarea anticorpilor nelegăți, prin etapele de spălare, stripurile individuale de nitroceluloză sunt incubate cu anticorpi IgG sau IgM anti-umani conjugați cu fosfataze alcaline. După ce anticorpii conjugați nelegăți au fost îndepărtați printr-o etapă ulterioară de spălare, vizualizarea complexului antigen / anticorp (al anticorpilor legați) este realizată prin adăugarea unui substrat incolor care formează precipitate albastru-violet (benzi de antigen) la fiecare loc în care s-au legat anticorpii anti-umani conjugați. Reacția enzimă / substrat este oprită prin spălarea stripurilor de nitroceluloză cu apă distilată / deionizată. În funcție de configurarea observată a benzilor se poate interpreta prezența anticorpilor IgG, respectiv IgM specifici.

3. Conținutul pachetului

3.1 Kit pentru 32 de determinări

1. Stripuri test de nitroceluloză pentru testarea IgG, respectiv IgM cu antigen aplicat, (stripuri solide stabilizate pe o folie de plastic), grupate într-un carnet, gata de utilizare	1x	32 plăci
2. Martor de întrerupere (cut off) IgG, respectiv IgM, ser uman, pre-diluat	1x	1,0 ml
3. Tampon de diluție / spălare , pH 7,3 (concentrație 10x), cu Tris și agent conservant	2x	50 ml
4. Conjugat IgG, respectiv IgM (concentrație 100x) anti-uman (capră) - fosfatază alcalină -, cu agent conservant	1x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gata de utilizare	1x	57 ml
6. Fixă de protocol de evaluare pentru notarea și arhivarea rezultatelor	1x	1 buc.

3.2 Kit pentru 96 de determinări

1. Stripuri test de nitroceluloză pentru testarea IgG, respectiv IgM cu antigen aplicat, (stripuri solide stabilizate pe o folie de plastic), grupate într-un carnet, gata de utilizare	3x	32 plăci
2. Martor de întrerupere (cut off) IgG, respectiv IgM, ser uman, pre-diluat	2x	1,0 ml
3. Tampon de diluție / spălare , pH 7,3 (concentrație 10x), cu Tris și agent conservant	4x	50 ml
4. Conjugat IgG, respectiv IgM (concentrație 100x) anti-uman (capră) fosfatază alcalină, cu agent conservant	3x	0,7 ml
5. Substrat (BCIP/NBT), gata de utilizare	3x	57 ml
6. Fixă de protocol de evaluare pentru notarea și arhivarea rezultatelor	3x	1 buc.

Suplimentar, sunt disponibile la cerere:

Martor IgG pozitiv sau IgM pozitiv, ser uman, control, pre-diluat, 0,5 ml.

Benzile pozitive ≥ Pentru banda de întrerupere (cut off) consultați certificatul livrat împreună cu kit-ul.

(Nr. comandă: IgG: WE222P60 / WE223P60 sau IgM: WE222P80)

Martor IgG / IgM negativ, ser uman, pre-diluat, 0,5 ml.

Martorul negativ nu indică bandă sau benzi relevante pentru evaluare. ≥ Bandă de separare.

(Nr. comandă: IgG/ IgM: WE222N10 sau WE223N60)

4. Depozitare și stabilitate

Depozitați kit-ul test la 2-8°C. Durata de valabilitate a componentelor individuale este menționată pe eticheta corespunzătoare; pentru durata de valabilitate a kit-ului consultați Certificatul de Control al Calității.

1. Nu expuneți componentele individuale ale kit-ului la temperaturi ridicate și nu le congelați.
2. Nu utilizați reactivii după data expirării.
3. Nu expuneți reactivii la lumină intensă pe durata depozitării sau a incubării.
4. Solușa substrat de BCIP/NBT este fotosensibilă și trebuie depozitată la întuneric.
5. **Stripurile test de nitroceluloză** : Utilizați stripurile imediat după ce au fost scoase din pungă. Închideți din nou în siguranță punga cu stripurile rămase și depozitați-o la 2-8°C. Atunci când arhivați rezultatele, aveți grijă ca stripurile test de nitroceluloză și cabloanele să fie protejate de lumina solară directă, pentru a evita decolorarea benzilor.

Material	Stare	Depozitare	Stabilitate
Probe de analiză	nediluate	de la +2 până la +8°C	1 săptămână
Stripuri de testare	după deschidere	de la +2 până la +8°C (depozitare în punga livrată)	3 luni
Controale	după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
Conjugat	după deschidere	de la +2 până la +8°C	3 luni
	diluat	de la +2 până la +8°C	cca 6 h
Substrat	după deschidere	de la +2 până la +8°C (ferit de lumină)	3 luni
Solușe de spălare	după deschidere	de la +2 până la +8°C (ferit de lumină)	3 luni
	diluare finală (gata de utilizare)	de la +2 până la +8°C	4 săptămâni
	diluare finală (gata de utilizare)	sau la temperatura camerei	2 săptămâni

5. Precauții și atenționări

1. Drept sururi martor vor fi utilizate numai sururile care au fost testate și al căror rezultat a fost negativ pentru anticorpii HIV1- ab, HIV2-ab, HCV-ab și antigenul de suprafață al hepatitei B. Totuși, probele, probele diluate, martorii și conjugatele, precum și stripurile cu antigen, trebuie considerate drept materiale potențial infecțioase. Manipulați produsele conform indicațiilor de laborator.
2. La efectuarea testului Immunoblot utilizați pense din plastic și purtați măști de protecție.
3. Respectați regulamentele locale în vigoare privind evacuarea deeurilor.
4. Băile de incubare sunt concepute de fabricant pentru unică folosință. Refolosirea băilor de incubare se face pe riscul utilizatorului. Dacă acestea urmează a fi refolosite, vă recomandăm ca după utilizare să dezinfectați băile de incubare timp de câteva ore într-o soluție de hipoclorit de sodiu 1%, să le săliți și apoi bine cu apă de robinet, urmată de apă distilată sau deionizată.

6. Materiale necesare suplimentar (nu se livrează)

1. Tavă de incubare (disponibilă la cerere, cu nr. comandă: WE300.08)
2. Masă vibratoare (verticală, nu centrifugă)
3. O sticlă de spălare (pissetă) pentru oprirea reacției
4. Aparat de spălare pipete sau aparat de spălare mâini
5. Micro-pipete 5 µl - 1.500 µl
6. Dispozitiv de umplere pipete
7. Eprubete, volum 2 - 20 ml

8. Pensul din plastic
9. Apul distilat sau deionizat
10. Hârtie de filtru

7. Materialul de examinare

Ca material de analiză se pot utiliza serul și plasma (aici tipul anticoagulantului nu are relevanță), chiar dacă în acest prospect se menționează numai serul. Pentru utilizarea lichidului cerebrospinal, consultați instrucțiunile de utilizare separate LINE lichid cerebrospinal.

8. Efectuarea testării

Premisa pentru obținerea unor rezultate corecte o constituie respectarea cu exactitate a modului de lucru conform manualului VIROTECH Diagnostics

8.1 Pregătirea probelor

1. Per probă pacient este nevoie de 15 µl ser sau plasmă. În cazul **procesării lichidului cerebrospinal / serului**, se utilizează exclusiv diluarea specială, calculată individual pentru lichid cerebrospinal / ser, în funcție de clasa Ig (a se vedea instrucțiunile de utilizare LINE lichid cerebrospinal).
2. Probele de sânge trebuie prelevate aseptice, prin puncție venoasă. După coagularea completă se separă serul (lipsește în cazul plasmăi). Pentru o depozitare mai îndelungată, serurile trebuie congelate la -20°C.
3. Se va evita repetarea congelării și decongelării.
4. Serurile inactivate termic, lipidice, hemolitice sau contaminate microbian, pot conduce la rezultate eronate și de aceea nu trebuie utilizate.
5. Nu utilizați probe de ser tulburi (în special după decongelare), eventual centrifugați-le, (5 minute la 1.000 g), pipetați supernatantul limpede și utilizați-l la testare.

8.2 Pregătirea reactivilor

1. Pentru a facilita activitatea de rutină din laborator, toate testele LINE și EcoBlot pot fi procesate într-o singură determinare, cu aceiași timpi de incubare și aceleași componente în când acestea sunt independente de parametri și karje. Martorii de întrerupere (cut off) au valori specifice parametrilor și lotului.
2. Înainte de diluare concentratul corespunzător trebuie adus la temperatura camerei. Utilizați numai apă distilată / deionizată de calitate superioară și înainte de folosire aduceți-o la temperatura camerei.
3. Amestecați bine diluările înainte de a începe testarea.
4. **Tampon de diluare / spălare:** Tamponul de diluare / spălare este livrat sub formă de concentrat 10x. Diluați tamponul concentrat de diluare / spălare 1:10 cu apă distilată sau deionizată (10 ml / 50 ml / 100 ml concentrat + 90 ml / 450 ml / 900 ml apă distilată sau deionizată), amestecați bine.
Atât varianta diluată cât și cea concentrată a tamponului de diluare/de spălare pot prezenta o colorașe gălbuie. Această colorașe nu influențează în niciun mod valabilitatea tamponului de diluare/de spălare sau funcționalitatea și capacitatea de diagnostic a setului de testare.
5. **Conjugatul IgG, respectiv IgM:** Diluați conjugatul 1 + 100 cu tampon de diluare / spălare diluat final și amestecați bine. Pentru fiecare probă de ser este nevoie de 1,5 ml de soluție de lucru cu conjugat. Vezi tabelul de diluare a conjugatului (punctul: Procedura testului).
6. **Solușă substrat:** Solușă substrat este livrată gata pentru utilizare.

8.3 Procedura testului Immunoblot

Atenție: Stripurile cu antigen pot fi testate numai pentru clasa Ig eliberată. (Vă rugăm consultați eticheta de pe carnetul blotului și marcajul de pe fiecare fâșie test în parte).

Pentru efectuarea și evaluarea corectă a testului Borrelia in vivo LINE, fiecare etapă de testare trebuie să includă martorii corespunzători de întrerupere (cut off) specifici parametrilor și lotului.

Pentru o diagnosticare sigură pentru Borrelia, testul LINE va fi efectuat în IgG și IgM.

1. Determinarea trebuie efectuată la temperatura camerei.
2. Pentru fiecare probă puneți 1 fâchie în canalul unei plăvi de incubare curate. Apucați fâchia numai de capătul superior marcat.
3. Pipetați câte 1,5 ml de **tampon de diluare / spălare** gata de utilizare la fiecare probă și puneți-le pe masa vibratoare. Aveți grijă ca stripurile cu antigen să fie complet acoperite cu lichid, deoarece stripurile nu au voie să se usuce pe durata întregii proceduri de testare.
4. Stripurile solide cu antigen sunt complet umezite în interval de un minut și pot fi incubate așezate cu fața în sus, lateral sau cu fața în jos.
5. Se pipetează câte **15 μl ser / plasmă de la pacient**, respectiv **100 μl substanță de stopare / control pozitiv sau negativ**, pe cât posibil pe porțiunea superioară a capătului marcat al stripului. Incubați serul de la pacient și martorul timp de **30 minute** pe masa vibratoare. Aveți grijă ca în timpul pipetării și golirii ulterioare să nu se producă nicio contaminare încrucișată a probelor pacienților.
6. Aspirați sau goliți cu atenție și complet lichidul din canale. În timpul golirii lichidului, stripurile cu antigen rămân pe fundul canalului. Scurgeți excesul de lichid pe o hârtie de filtru.
7. **Spălarea** stripurilor: incubați cu câte 1,5 ml de tampon de diluare / spălare gata de folosire timp de **3 x 5 minute** pe masa vibratoare. Goliți sau aspirați întotdeauna în totalitate tamponul de spălare. Înaintea finalizării ultimei etape de spălare, pregătiți cantitatea necesară de dilușe de conjugat proaspăt preparat (vezi tabelul).
8. Aspirați sau goliți în totalitate lichidul din canale (vezi punctul 6).
9. Pipetați câte 1,5 ml din **dilușă de conjugat** preparată, în canalul de incubare corespunzător și incubați timp de 30 minute pe masa vibratoare.
10. Goliți sau aspirați în totalitate lichidul din canale.
11. **Spălarea** stripurilor: incubați cu câte 1,5 ml tampon de dilușe / spălare gata de folosire **3 x 5 minute** pe masa vibratoare. Goliți sau aspirați întotdeauna în totalitate solușă tampon de spălare. Clătiți apoi **1 x 1 minute** cu **apă distilată / deionizată**.
12. Goliți sau aspirați în totalitate lichidul din canale (vezi punctul 6).
13. Pipetați câte 1,5 ml din **solușă substrat** gata preparată în canale și lăsați să reacționeze timp de **10 ± 3 minute** pe masa vibratoare.
14. **Stopați** reacția de culoare prin scurgerea solușei substrat. Spălați apoi fiecare fâchie fâcile incubare intermediară, de **3 x** cu câte 1,5 ml de **apă distilată / deionizată**.
15. Scurgeți apa distilată / deionizată și lăsați fâchia să se usuce pe o coală curată de hârtie absorbantă. Colorarea fundalului, care poate fi observată pe stripurile cu antigen, umeze, dispare în totalitate când stripurile s-au uscat complet. Stripurile de antigen compacte necesită un timp de uscare complet mai lung decât în cazul stripurilor de antigen convenșionale.
16. Pentru interpretare utilizați protocolul de calcul anexat. Notarea benzii de înaltă specificitate pe fîcă de protocol face mai ușoară interpretarea probelor pacienților.

Pentru schema procedurii de testare vedeți ultima pagină

8.4 Utilizarea procesoarelor pentru Immunoblot

Pentru procesarea automatizată a blot-urilor și LINE-urilor sunt omologate următoarele aparate: Apollo și Profiblot. În principiu se pretează toate bloturile automate uzuale în comerț

9. Interpretarea rezultatelor

Pentru o interpretare precisă, fiecare test LINE este prevăzut cu doi martori:

1. **Martor pentru ser:**
Banda de incubare a serului apare sub linia marcatore numai după incubarea cu serul pacientului.
2. **Martor pentru conjugat:**
Fâșia LINE dispune de o bandă martor pentru conjugat, care apare după incubarea cu conjugatul corespunzător.

Procedura de testare este valabilă, dacă pe fâșia cu antigen dezvoltată apar clar atât martorul serului, cât și martorul intern al conjugatului.

Din fîșia de protocol puteți stabili poziția exactă a benzii pentru martorul serului și cel al conjugatului.

9.1 Interpretarea probelor pacienților

Consultați fîșia de protocol privind poziția și nota benzilor reactive.

Benzile IgM: OspC, VlsE-Mix, p39 și o bandă EBV pentru diagnosticul de excludere

Benzile IgG: Benzile VlsE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) și TpN17 pentru testarea în scopul diagnosticului de excludere (numai cu WE 223G)

9.2 Utilizarea martorului de întrerupere (Cut off)

Benzile cu intensitate mai slabă față de banda cut off nu vor fi luate în considerare pentru interpretare.

Banda cut off IgM: OspC

Banda cut off IgG: VlsE-Mix

9.3 Semnificația antigenelor

Lista antigenelor **de *Borrelia burgdorferi***, de înaltă puritate (OspC) și recombinante (VlsE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 și pG), Antigenul Viral Capsidic gp125 al EBV și antigenul TpN17. VlsE-Mix constă din două antigene recombinante ale genospeciilor ***Borrelia burgdorferi*** s. s. și ***Borrelia garinii***.

Antigen/ Denumire	Semnificația antigenilor	Specificitatea anticorpilor în LINE	Tulpini originale/Filtrare
OspC (p23), antigen nativ curățat	Outer surface-protein C. Lipoproteină codată plasmidică (6, 22, 26, 28). Marker important pentru manifestările boreliozei Lyme în serologia IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). <u>Semnificație biologică:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. necesită OspC probabil pentru infectarea inițială cu succes a gazdei mamifere (46, 47, 48, 49). Spirochetele secretă OspC în căpușă în timp ce aceasta se hrănește cu sânge în prima fază a infecției gazdei mamifere (46). După transferul spirochetelor în mamiferi, secreția de OspC este redusă. Pentru o infecție persistentă, lipoproteina nu pare necesară (47, 47). Tilly et al. presupun că OspC împiedică, în prima fază a infecției gazdei mamifere, fagocitoza spirochetelor (50).	Specific (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (izolată la origine din leziunea Erythema migrans la om în Germania) / filtrată prin SDS-Page preparatorie
VlsE, recombinant	Variable major protein like sequence E. Lipoproteină <i>B. burgdorferi</i> - secretată in vivo , care prezintă epitopi puternic imunogeni, conservă înțeles asociat cu genospecii. În serologia IgM, s-au remarcat reacții contra VlsE, în special la serurile pacienților cu borelioza Lyme incipientă. În serologia IgG, s-au remarcat reacții contra VlsE la serurile pacienților cu borelioza Lyme incipientă și avansată. În serologia IgG, VlsE funcționează ca un marker al boreliozei Lyme independent de stadiul de îmbolnăvire. VlsE este un antigen 35-kDa, codat în lp28-1 (2). <u>Semnificație biologică:</u> <i>B. burgdorferi</i> s.l. poate persista la mamifere infectate, în ciuda	Specific	<i>B. burgdorferi</i> B31 (izolată, la origine, dintr-o căpușă infectată din Shelter Island, N. Y.), <i>B. garinii</i> IP90 (izolată, la origine, dintr-o căpușă infectată din Rusia) /

	reacții lor imune active. Se presupune că variația de antigen combinatoric a proteinei de suprafață VlsE contribuie la această persistență ca mecanism de imune escape (51, 52, 53).		Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografie de afinitate Ni-NTA
p39-(BmpA), recombinant	Borrelial membrane protein A. Marker central, codat cromozomial (6, 19) în serologia IgG, pentru infecțiile de borelioza Lyme diseminate (4, 8, 18). Proteinele Bmp sunt lipoproteine cu funcție necunoscută.	Foarte specific (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (izolat, la origine, din leziunea umană Erythema migrans, în Germania)/ Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografie de afinitate Ni-NTA
p83/100, recombinant	Antigen asociat cu cilindrul protoplasmei, codat cromozomial (12, 13), conservat în interiorul <i>B. burgdorferi</i> s. l. (17) Marker central în serologia IgG pentru borelioze Lyme avansate (8, 24, 29).	Foarte specific (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	<i>B. afzelii</i> PKo (izolat, la origine, din leziune umană Erythema migrans, în Germania) /Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografie de afinitate Ni-NTA
BBA36 (iv1)*, recombinant	Antigen <i>B. burgdorferi</i> 22 kDa secretat <i>in vivo</i> , codat în lp54. BBA36 prezintă epitopi puternic imunogeni, nespecfici unei anumite genospecii. BBA36 este un marker important pentru boreliozele Lyme avansate (infecții diseminate) în serologia IgG (10).	Foarte specific	<i>B. afzelii</i> MMS (izolat, la origine, dintr-o căpușă infectată, în Germania)/ Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografia de afinitate Ni-NTA
BBO323 (iv2)*, recombinant	Antigen <i>B. burgdorferi</i> kDa 42 secretat <i>in vivo</i> , codat cromozomial. BBO323 prezintă epitopi puternic imunogeni, nespecfici unei anumite genospecii. BBO323 este un marker important pentru boreliozele Lyme avansate (infecții diseminate) în serologia IgG. (54)	Specific	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (izolat, la origine, dintr-o căpușă infectată în Germania)/ Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografia de afinitate Ni-NTA
Crasp3 (iv3)*, recombinant	Complement regulator-acquiring surface protein3. Antigen de suprafață <i>B. burgdorferi</i> 21 kDa secretat <i>in vivo</i> , codat în cp32-8. Membru al familiei Erp. Marker important pentru boreliozele Lyme avansate (infecții diseminate) în serologia IgG. Crasp3 susține rezistența la complement (11, 54).	Foarte specific	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (izolat, la origine, dintr-o căpușă infectată în Germania)/ Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografia de afinitate Ni-NTA
pG (iv4)*, recombinant	Antigen <i>B. burgdorferi</i> 22 kDa secretat <i>in vivo</i> , codat în cp32-3. Membru al familiei Erp. Marker important pentru boreliozele Lyme avansate (infecții diseminate) în serologia IgG (16).	Foarte specific	<i>B. burgdorferi</i> ZS7/ <i>B. afzelii</i> MMS (izolat la origine dintr-o căpușă infectată din Germania)/ Filtrat din <i>E. coli</i> prin cromatografie de afinitate

EBV VCA-gp125	Epstein Barr imunodominant în Virus Capsid Antigen Anticorpii IgM contra VCA-gp125 dispar, de obicei, din nou, la câteva săptămâni după infecția primară cu EBV.	Marker foarte specific în serologia IgM pentru o infecție primară cu EBV	Filtrarea gp125 are loc din Ganzzellysat (celule umane infectate cu EBV), prin cromatografie de afinitate, folosind un anticorp monoclonal anti- gp125
Treponema pallidum TpN17 recombinant (doar pentru WE223G)	Marker pentru sifilis primar, secundar și latent	foarte specific pentru toate stadiile infecției	Treponema pallidum Filtrat din <i>E coli</i> prin cromatografie de afinitate Ni-NTA

*(iv1-4) = antigene exprimate in vivo (iv)

9.4 Criterii de interpretare

Interpretarea rezultatelor serologice va include întotdeauna tabloul clinic, datele epidemiologice și alți parametri de diagnosticare.

Evaluarea generală (IgG și IgM) recomandată a antigenelor de Borrelia

Pentru o diagnosticare sigură a Borreliei, testul LINE va fi efectuat și interpretat în cadrul IgG și IgM.

Vor fi luate în considerare numai benzile cu intensitate ≥ față de banda cut-off.

Banda (benzile) apărute(e) în IgM		Banda (benzile) apărute(e) în IgG	Interpretare
Nicio bandă, respectiv benzi < față de banda cut-off	sau	Nicio bandă, respectiv benzi < față de banda de cut-off sau 1 bandă IgG (cu excepția VlsE)	negativ
1 bandă IgM (cu excepția OspC)	sau	Bandă VlsE IgG	la limită
Bandă OspC IgM sau ≥ 2 benzi IgM	sau	≥ 2 benzi IgG	pozitiv
1 bandă IgM	și	1 bandă IgG	pozitiv (*)

(*) Gruparea benzilor din ultimul rând gri ilustrează combinașă dintre o singură bandă în IgM plus o bandă în IgG. Rezultatul total (IgG și IgM) trebuie considerat pozitiv.

Interpretarea recomandată cu EBV-gp125 pozitiv în serologia IgM

În contextul infecțiilor primare cu EBV se poate ajunge la reactivitatea ale anticorpilor față de antigenele *Borrelia burgdorferi* **sensu lato**, datorită stimulării celulelor B policlonale (55). Aceasta poate conduce la un fals rezultat pozitiv pentru borelioza Lyme. Pentru a diminua diagnosticale greșite de acest gen, testul VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot conține Antigenul Capsidic Viral Epstein Barr gp125. Dacă în serologia IgM și / sau IgG nu numai antigenele Borrelia, ci și gp125

reacșionează cu o intensitate cel puțin de valoarea benzii cut-off a IgM, situașă EBV definitiv a serului trebuie verificată ca o măsură de precaușe (de ex. cu VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; nr. comandă: WE102G32/96 ki VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot; nr. comandă: WE102M32/96).

Banda **EBV-gp125** nu a fost autorizată pentru testarea în scopul diagnosticării în lichidul cerebrospinal.

Evaluare recomandată pentru banda TpN17

Banda de antigen *Treponema pallidum* TpN17 (numai cu WE223G)

La testarea serului în scopul diagnosticării boreliozei Lyme se observă reacșii încrucicate cu alte microorganisme. Infecșii cu virusul herpetic (în special EBV) ki infecșii bacteriene, cum ar fi sifilisul, joacă un rol important. MiQ12/2000 pentru borelioza Lyme face următoarea recomandare: Dacă testul de clasificare este la limită sau pozitiv (în serologia boreliozei Lyme), trebuie efectuat un test pentru sifilis (de ex. TPHA) pentru excluderea rezultatelor fals pozitive din cauza unei reacșii încrucicate a anticorpilor față de *Treponema*.

Banda TpN17 servește la recunoașterea rezultatelor false la limită sau fals pozitive la testarea serului în scopul diagnosticării boreliozei Lyme, din cauza reacșii încrucicate a anticorpilor provenișe de la infecșă cu *Treponema pallidum* (sifilis).

Dacă la VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot banda TpN17 reacșionează $\geq$ față de banda cut-off IgG ki în acelaki timp există antigene de Borrelia în IgM ki / sau IgG, trebuie testată ca o măsură de precaușe situașă definitiv a sifilisului în ser (de ex. cu VIROTECH Treponema pallidum LINE, nr. comandă: IgG: WE150G16/32 ki IgM: WE150M16/32).

Este esenșial a se reșine următoarele aspecte:

- Banda TpN-17 nu poate înlocui diagnosticarea diferenșială completă a sifilisului cu privire la sensibilitate ki specificitate.
- bandă negativă de antigen TpN17 nu exclude, în principiu, posibilitatea ca să fie prezenș anticorpii față de *Treponema pallidum*.
- Un rezultat pozitiv cu banda de antigen TpN17 trebuie confirmat cu ajutorul unui test adecvat de confirmare pentru *Treponema pallidum* (de ex. VIROTECH WE150).
- Banda TpN-17 nu a fost validată pentru utilizarea la testarea în scopul diagnosticării în lichidul cerebrospinal.

Imagini tipice ale rezultatelor

Succesiunea antigenelor pe fâșia Borrelia in vivo LINE a fost aleasă astfel încât antigenele care reacșionează preponderent cu anticorpii pacienșor având borelioză Lyme în stadiu incipient (de ex.: OspC, VlsE-IgM, VlsE-IgG) să fie localizate în partea superioară a fâșiei (lângă linia marcatoare). Antigenele care reacșionează preponderent cu anticorpii pacienșor cu borelioză Lyme în stadiu avansat (de ex.: p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG) sunt în partea inferioară a fâșiei (departe de linia marcatoare). Deja prin aceasta, reprezentarea vizuală a amplasării benzilor indică stadiul infecșei (de la borelioza Lyme în stadiu incipient la cea în stadiu avansat).

Exemple de imagini ale benzilor în următoarele stadii ale infecșei:

Stadiu borelioză	Serologia IgM	Serologia IgG
Borelioză Lyme în stadiu incipient	OspC	VlsE
	VlsE	VlsE
	p39	VlsE
	mai mult de 2 benzi	fără benzi sau VlsE
	OspC	fără benzi
Borelioză Lyme diseminată	Este posibil să nu apară nicio bandă sau să apară toate benzile IgM.	VlsE ki p39
		2 benzi

Borelioză Lyme în stadiu avansat	Benzile IgM apar progresiv în fundal.	Odată cu evoluția infecției apar de regulă din ce în ce mai multe benzi IgG în diferite combinații. p39, p83, VlsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 și pG)
---	---------------------------------------	--

9.5 Limitele testului

1. Un rezultat blot negativ nu exclude complet posibilitatea unei infecții cu *B. burgdorferi* s.l. . Este posibil ca proba să fi fost recoltată înainte de apariția anticorpilor sau că titrul de anticorpi există sub limita de detectare a testului.
2. Tratarea pacienților cu antibiotice în stadiul incipient al bolii (35, 37) poate conduce la suprimarea răspunsului imun, astfel încât nu se mai pot detecta anticorpii anti-*B. burgdorferi*.
3. Reacția încrucișată dintre *Borrelia* și alte spirochete poate conduce la apariția unor benzi asociate cu *Borrelia* la testul Western Blot, ceea ce poate conduce la un rezultat fals pozitiv. Serurile pacienților cu următoarele infecții pot reacționa încrucișat: sifilis (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenue*), febra recurentă (*Borrelia spezia*), leptospiroza (*Leptospira spec.*) (38). În egală măsură pot apărea reacții încrucișate în cazul virusului herpetic (EBV, CMV, parvovirusului) (34, 39). Dacă testul VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE223G) indică reactivitate nu numai la antigenele pentru borelioză Lyme, ci și reactivitate la antigenul TpN17, consultați comentariile de la punctul 9.4 (Evaluarea recomandată pentru banda TpN17).
4. În contextul infecțiilor primare cu EBV se poate ajunge la reactivitatea anticorpilor față de antigenele *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ca urmare a stimulării celulelor B policlonale (34, 39). Dacă testul VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot indică nu numai reactivitate IgM și / sau IgG față de antigenele de *Borrelia*, ci și reactivitate față de EBV-gp125, trebuie exclusă diagnosticarea diferențială a mononucleoziei.
5. În cazuri rare, pacienții pot prezenta benzi înverse (fundal întunecat, benzi albe); acestea nu trebuie luate în considerare, însemnând că testul Immunoblot- nu poate fi evaluat în astfel de cazuri. Serul trebuie testat cu ajutorul altor metode serologice.
6. Consultați limitele testului, enumerate în capitolul 2: *Relevanța diagnostică*

10. Referințe

1. Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease J. infect Dis. 176:392-400
5. Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Detection of antibodies to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. J. Rheumatol. 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Interpretation criteria for Standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*. Med. Microbiol. Immunol. 185:121-129
10. Wallich, R. et al.; Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease; Eur. J. Immunol. 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family; Eur. J. Immunol. 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG

- responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. Clin. Microbiol. 28:1673-1676 13. 13. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. Infect. Immun. 60:4309-4321
13. Ma et al., 1992 Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30:370-376
 14. Moskopidhis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. lab. Med. 19:231-237
 15. Wallich, R. et al.; Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo; Infection and Immunity 1995 Sept:3327-3335
 16. Roessler et al., 1995 Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
 17. Roessler et al., 1997 Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies variability on Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
 18. Simpson et. al., 1990 reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
 19. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
 20. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95
 21. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
 22. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
 23. Wilske et al., 1988 Immunochemische Analyse der Immunantwort bei Spätmanifestationen der Lyme Borreliose. Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
 24. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
 25. Wilske & Preac-Mursic 1993 Microbiological diagnosis of Lyme Borreliose in: Aspects of Lyme borreliosis: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
 26. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis, J. Infect. Dis. 169: 313-318
 27. Wilske et al., 1993 Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 61:2182-2191
 28. Wilske et al., 1994 Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
 29. Wilske, 1995 Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Internist 36:114-119
 30. Wilske et al., 1997 Borrelien. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
 31. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
 32. Oschmann und Kraicz, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag
 33. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
 34. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelieninfektion, Clin. Lab. 44: 897-902
 35. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78: 934-39
 36. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
 37. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88
 38. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231
 39. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-

- 19.
40. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
41. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B. (2007) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. Nov. Int J Med Microbiol. 2008; 298(3-4): 279-90
42. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, P. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resist complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and FHL-1. Infect Immun. 75(10): 4817-25
43. Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J. (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 37: 3025-3028
44. Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.
45. Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3142-3147
46. Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. Infect Immun 74: 3554-3564
47. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. Infect Immun 74: 5177-5184
48. Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T. (2007a) Identification of an ospC operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 64: 220-231
49. Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. Infect Immun 75: 1517-1519
50. Bankhead, T., Chaconas, G. (2007) The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. Mol Microbiol. 65(6): 1547-58
51. Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B. (2006) Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. J Bacteriol 188: 4879-4889
52. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
53. Nowalk et al. (2006), Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins, Infection and Immunity 74, No.7: 3864-3873
54. Poggensee, G. et al (2008), Lyme.Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze, Bundesgesundheitsblatt 50: 1329-1339

11. Simboluri



=> consulta manualul de utilizare

12. Schema procedurii de testare

Versiunea prescurtată a procedurii de testare

Incubare probe	30 minute	15 µl ser / plasmă pacient / 100 µl martor în câte 1,5 ml de tampon de diluare / spălare
Spălare	3 x 5 minute	cu câte 1,5 ml de tampon de diluare / spălare
Incubare conjugat	30 minute	cu 1,5 ml dilușe de lucru (1 + 100)
Spălare	3 x 5 minute 1 x 1 minute	cu câte 1,5 ml de tampon de diluare / spălare cu apă distilată / deionizată
Incubare substrat	10 ± 3 minute	fiecare cu câte 1,5 ml solușe substrat gata de utilizare
Oprirea reacției	3 x 15 secunde	fiecare cu câte 1,5 ml de apă distilată / deionizată

Tabel diluare conjugat (valori rotunjite)

Numărul de stripuri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tampon diluare / spălare	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Concentrat de conjugat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volum final	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Numărul de stripuri	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tampon diluare / spălare	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Concentrat de conjugat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volum final	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Numărul de stripuri	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Tampon diluare / spălare	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Concentrat de conjugat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volum final	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Numărul de stripuri	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Tampon diluare / spălare	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Concentrat de conjugat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volum final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml