

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

Numer zamówienia: WE222G32; WE222G96

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

Numer zamówienia: WE222M32; WE222M96

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

Numer zamówienia: WE223G32; WE223G96

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim
Telefon: +49-6142-6909-0
Faks: +49-6142-82621
<http://www.virotechdiagnostics.com>



Freigabedatum: 20.6.2018

REV 30 / VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot PL

Spis treści

1. Cel zastosowania.....	3
2. Zasada przeprowadzania badania.....	3
3. Zawartość opakowania.....	3
3.1 Zestaw dla 32 okreŝceń.....	3
3.2 Zestaw dla 96 okreŝceń.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz odczynników	4
5. Środki ostrożności oraz wskazówki ostrzegawcze	4
6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezałączone w zestawie)	4
7. Materiał badawczy	5
8. Przeprowadzanie testu /badania/	5
8.1 Przygotowanie próbek.....	5
8.2 Przygotowywanie odczynników	5
8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot	5
8.4 Zastosowanie procesorów Immunoblot	6
9. Ocena wyników badania.....	7
9.1 Ocena próbek pacjentów	7
9.2 Zastosowanie kontroli typu Cut off.....	7
9.3 Znaczenie antygenów	7
9.4 Kryteria oceny.....	9
9.5 Granice testu	11
10. Literatura.....	12
11. Symbole	14
12. Schemat przebiegu testu.....	15

1. Cel zastosowania

Zestaw testowy linii Immunoblot do jakościowego wykazywania swoistych przeciwciał IgG lub IgM *B.burgdorferi* sensu lato w surowicy ludzkiej.

Oprócz zastosowania w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme test IgG Line Immunoblot nadaje się do zastosowania w diagnostyce pęnu mózgowo-rdzeniowego na neuroboreliozy. W celu zastosowania w diagnostyce pęnu mózgowo-rdzeniowego należy zamówić osobną instrukcję roboczą.

2. Zasada przeprowadzania badań

Antygeny czynnika chorobotwórczego są przenoszone za pomocą specjalnej metody rozpyłowej na membrany nitrocelulozowe. Membrana nitrocelulozowa zostaje następnie pocięta na pojedyncze paski.

Inkubacja opłaszczonych antygenami pasków z próbkami surowicy ludzkiej/osocza ludzkiego pozwala na oznaczenie obecnych swoistych przeciwciał. Te przeciwciała stanowią immunokompleksy ze znajdującymi się na paskach testowych i tam umocnionymi antygenami. Po usunięciu niezwiązanych przeciwciał poprzez poszczególne kroki procedury mycia pojedyncze paski nitrocelulozy zostają inkubowane wraz z antyludzkimi przeciwciałami IgG lub IgM koniugowanymi alkaliczną fosfatazą. Po usunięciu poprzez dalszy krok w procedurze mycia niezwiązanych skoniugowanych przeciwciał następuje uwidocznienie kompleksów antygenów/przeciwciał/przeciwciał związanych/ poprzez dodanie niebarwionego podłoża-substratu, który w wyniku enzymatycznej przemiany wytwarza niebiesko-fioletowe pasma /pasma antygenów. Reakcja enzymatyczno-substratowa zostaje zahamowana poprzez przemycie pasków nitrocelulozowych przy pomocy wody destylowanej /dejonizowanej/. W zależności od zaobserwowanego wzoru pasm można zamknąć /procedurę/ w odniesieniu do obecności swoistych przeciwciał IgG lub IgM.

3. Zawartość opakowania

3.1 Zestaw dla 32 określeń

- | | | |
|--|----|-----------|
| 1. Paski testowe nitrocelulozowe IgG lub IgM z naniesionymi antygenami, wzmocnione folią, posortowane w zeszycik, gotowe do użycia | 1x | 32 pasków |
| 2. Sprawdzian IgG lub IgM typu Cut off, surowica ludzka, po rozcieńczeniu wstępnym | 1x | 1,0 ml |
| 3. Bufor do rozcieńczenia/płukania , pH 7,3 (10x stęż.), ze środkiem konserwującym i Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Koniugat IgG lub IgM Koniugat (100x skoncentrowany) antyludzki, (kozia)-alkaliczna fosfataza, ze środkiem konserwującym | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gotowy do użycia | 1x | 57 ml |
| 6. Karta protokołu czynności oceniania do protokołowania i archiwizowania wyników | 1x | 1 sztuka. |

3.2 Zestaw dla 96 określeń

- | | | |
|--|----|-----------|
| 1. Paski testowe nitrocelulozowe IgG lub IgM z naniesionymi antygenami, wzmocnione folią, posortowane w zeszycik, gotowe do użycia | 3x | 32 pasków |
| 2. Sprawdzian IgG lub IgM typu Cut off, surowica ludzka, po rozcieńczeniu wstępnym | 2x | 1,0 ml |
| 3. Bufor do rozcieńczenia/płukania , pH 7,3 (10x stęż.), ze środkiem konserwującym i Tris | 4x | 50 ml |
| 4. Koniugat IgG lub IgM Koniugat (100x skoncentrowany) antyludzki, (kozia)-alkaliczna fosfataza, ze środkiem konserwującym | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrat (BCIP/NBT), gotowy do użycia | 3x | 57 ml |
| 6. Karta protokołu czynności oceniania do protokołowania i archiwizowania wyników | 3x | 1 sztuka. |

Na życzenie dostępne również

IgG wzgl. IgM- kontrola dodatnia, ludzka surowica, po rozcieńczeniu wstępnym, 0,5 ml.

Pasma dodatnie ≥ punkt odcięcia można znaleźć w załączonym certyfikacie.

(nr katalog.: IgG: WE222P60 / WE223P60 wzgl. IgM: WE222P80)

IgG/IgM- kontrola ujemna, ludzka surowica, po rozcieńczeniu wstępnym, 0,5 ml.

Kontrola ujemna nie wykazuje żadnych pasm wzgl. żadnych istotnych dla interpretacji pasm ≥ punktu odcięcia.

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Poszczególnych odczynników nie należy zamrażać i nie wystawiać ich na działanie wysokich temperatur.
2. Nie używać odczynników po upływie ich daty ważności.
3. Należy unikać składowania odczynników w sytuacji /w pomieszczeniach/ jaskrawego światła.
4. Roztwór substratu BCIP/ NBT wrażliwy jest na światło, dlatego przechowywany musi być w pomieszczeniach /naczyniach/ ciemnych.
5. **Paski testowe nitrocelulozowe:** Po wyjściu pasków z torebki należy ich natychmiast użyć. Torebki z nieużywanyymi paskami natychmiast znowu szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze od 2 do 8°C. Dla archiwizowania wyników paski testowe nitrocelulozowe muszą być koniecznie chronione przed bezpośrednim światłem słonecznym celem uniknięcia napęcznienia poszczególnych tasiemek.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Stabilność
Próbki	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Paski testowe	po otwarciu	+2 do +8°C (przechowywanie w dostarczonej torebce)	3 miesiące
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	ok. 6 h
Substrat	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
Roztwór do pokłania	po otwarciu	+2 do +8°C (chronić przed światłem)	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +8°C	4 tygodnie
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	lub temperatura pokojowa	2 tygodnie

5. Środki ostrożności oraz wskazówki ostrzegawcze

1. Jako surowice kontrolne stosowane są tylko takie surowice, która zostały przebadane i uzyskały wynik negatywny na przeciwciała przeciw HIV1, HIV2, HCV i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Surowice kontrolne, próbki, próbki rozcieńczone, koniugaty i nitrocelulozowe paski testowe należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązuje odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. W trakcie przeprowadzania procedury Immunoblot należy nosić rękawice jednorazowego stosowania i używać pincety plastikowej.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.
4. Tace do inkubacji są przeznaczone przez producenta tylko do jednorazowego użycia. Wielokrotne użycie tac do inkubacji następuje na odpowiedzialność użytkownika. W przypadku ewentualnego wielokrotnego zastosowania zalecamy dezynfekcję tac do inkubacji po użyciu przez kilka godzin w 1% roztworze podchlorynu sodu, ich czyszczenie oraz dokładne płukanie wodą wodocigową i wodą destylowaną / dejonizowaną.

6. Materiały dodatkowo potrzebne (niezałączone w zestawie)

1. Wanna inkubacyjna /w razie konieczności można ją otrzymać pod numerem zamówienia WE300.08/
2. Wstrząsacz /pionowy, nie centryfugalny/
3. Butelka do wstrzyknięć dla wykonywania pomiarów
4. Pipeta lub urządzenie do mycia ręcznego
5. Mikropipeta 5 µl - 1500 µl
6. Nasadki do pipet

7. Rurki próbnicze /tubki do próbek/ - o pojemności od 2 do 20 ml
8. Pinceta plastikowa
9. Woda destylowana lub dejonizowana
10. Papier filtracyjny /filtrowy/

7. Materiał badawczy

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica. W celu zastosowania płynu mózgowo-rdzeniowego należy zapoznać się z odrębną instrukcją stosowania Liquor LINE.

8. Przeprowadzanie testu /badania/

Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych VIROTECH Diagnostics jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.

8.1 Przygotowanie próbek

1. Na próbkę pacjenta wymagane jest 15 µl surowicy lub osocza. Przy **przetworzeniu płynu mózgowo-rdzeniowego/surowicy** należy stosować wyłącznie indywidualnie obliczone rozcieńczenie płynu mózgowo-rdzeniowego/surowicy w zależności od klasy Ig (patrz instrukcja stosowania Liquor LINE).
2. Probki krwi należy pobierać w warunkach aseptycznych poprzez punkcję żyły. Po całkowitej koagulacji należy oddzielić surowicę (nie dotyczy osocza). Chcieć przechowywać próbki dłużej surowicę należy zamrażać w temperaturze -20°C.
3. Unikać należy powtórnego zamrażania i rozmrażania surowicy.
4. Surowice, które zostały zaktywizowane w temperaturze dodatniej, lipemicznie, hemolitycznie lub kontaminowane mikrobiologicznie prowadziły do sfałszowanych wyników, dlatego te nie powinny być używane i wykorzystywane.
5. Nie używać i nie wykorzystywać zmrożonych próbek surowicy /w szczególności po ich rozmrożeniu/, w razie konieczności centrifugować /5 minut w sytuacji 1000 x g/, wyklarować /oczyścić/, odpipetować warstwę górną, po czym wykorzystać w teście badawczym.

8.2 Przygotowywanie odczynników

1. W celu dostosowania do procedur laboratoryjnych możliwe jest przetwarzanie wszystkich testów LINE i EcoBlot w jednym przebiegu testu z takimi samymi czasami inkubacji i składnikami niezależnymi od parametrów/serii. Kontrole cut off sN stosowane w sposób swoisty dla parametrów i serii.
2. Przed rozcieńczeniem wszystkich odczynników testowych aktualny/dany koncentrat doprowadzić należy do temperatury pokojowej. Używać jedynie wody destylowanej /dejonizowanej/ wysokiej jakości, a badania i testy przeprowadzać w temperaturze pokojowej.
3. Roztwory rozcieńczone należy przed zastosowaniem ich do testów dobrze przemieszać.
4. **Środek myjny buforowy rozcieńczający**
Bufor do rozcieńczenia/płukania jest dostępny w 10-krotnym stężeniu. Koncentrat buforu do rozcieńczenia/płukania rozcieńczyć w stosunku 1:10 wodą destylowaną lub dejonizowaną (10ml/50ml/100ml koncentratu + 90ml/450ml/900ml wody dest./dejonizowanej), dobrze wymieszać.
Zarówno stężony, jak i rozcieńczony bufor do rozcieńczenia/płukania może mieć ewentualnie łagłe zabarwienie. Takie łagłe zabarwienie nie ma wpływu na okres trwałości buforu do rozcieńczenia/płukania, ani na funkcjonalność i znaczenie diagnostyczne testu.
5. **Koniugat IgG lub IgM**
Koniugat rozcieńczyć 1 + 100 ostatecznie rozcieńczonym buforem do rozcieńczenia/płukania. Dobrze wymieszać. Na jedną próbkę surowicy wymagane jest 1,5 ml roztworu użytkowego koniugatu. Patrz tabela rozcieńczenia koniugatu (punkt: "Schemat przebiegu badania").
6. **Roztwór substratu**
Roztwór substratu dostarczany jest w stanie gotowym do użytku.

8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot

Uwaga: Nitrocelulozowe paski testowe testowane były mogą jedynie w dozwolonej klasie Ig /zobacz - etykieta na zeszyciku Blot oraz określenie na każdym poszczególnym pasku testowym/..

Do prawidłowego wykonania i oceny testu *Borrelia* in vivo LINE w każdej próbie musi występować swoista dla parametrów i serii kontrola cut off.

Dla pewnego zdiagnozowania *Borrelia* LINE, należy ją przeprowadzać w opcji IgG oraz IgM.

1. Test przeprowadzać należy w temperaturze pokojowej.
2. W odniesieniu do każdej próbki włożyć każdorazowo 1 pasek do rynny czystej wanny inkubacyjnej. Paski dotykać należy możliwie jedynie na oznakowanym górnym ich końcu.
3. Pipetować każdorazowo 1,5ml gotowego do użycia **środek myjny buforowy rozcieńczający**, po czym ustawić na wstrząsaczu. Zwracać przy tym uwagę na to, by paski testowe nitrocelulozowe równomiernie przykryte były płynem, paski testowe bowiem nie mogą ulegać procesowi wysychania w trakcie całego okresu przeprowadzania testu.
4. Przykryte płynem /dosz schowane/ paski testowe nitrocelulozowe całkowicie silić w czasie jednej minuty, i inkubowane być mogą zarówno w położeniu grzbietowym, brzuszным lub bocznym.
5. Dodać pipetą po **15 µl surowicy/osocza pacjenta** lub **100 µl** kontroli cut off/pozytywnej/negatywnej, w miarę możliwości przy górnym, oznaczonym końcu paska. Surowicę pacjenta oraz kontrolę inkubować na wstrząsaczu przez okres 30 minut. W trakcie pipetowania i koniecznego odlewania zwracać uwagę na to, by nie doszło do kontaminacji krzyżowej/skrzyżowanej poszczególnych próbek pacjentów.
6. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub ostrożnie odlać ten płyn. W przypadku odlewania płynu paski testowe nitrocelulozowe pozostają na spodzie rynien i przylegają do nich. Pozostałe resztki płynu odkroplić na papier chłonny /bibułę/.
7. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użycia **środku myjnego buforowego rozcieńczającego** w czasie 3 x 5 minut. Za każdym razem bufor myjny całkowicie odessać lub odlać. Przed zakończeniem ostatniego kroku myjnego sporządzić potrzebną ilość roztworu w oparciu o **Świeży roztwór koniugatu** /zobacz - tabela/.
8. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać /zobacz - punkt 6/.
9. Pipetować każdorazowo 1,5 ml sporządzonego **roztworu koniugatu** do odpowiednich rynien inkubacyjnych, po czym inkubować go na wstrząsaczu **30 minut**.
10. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać.
11. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użycia **środku myjnego buforowego rozcieńczającego** w czasie 3 x 5 minut. Za każdym razem bufor myjny całkowicie odessać lub odlać. Następnie spłukać **wodą destylowaną lub wodą dejonizowaną w czasie 1 x 1 minuta**.
12. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać (zobacz - punkt 6).
13. Pipetować każdorazowo 1,5 ml gotowego do użycia **roztworu substratu** do rynien, po czym rozwijać go w czasie **10 ± 3 minuty** na wstrząsaczu.
14. **Zatrzymać** proces nabierania barwy poprzez odlanie roztworu substratu. Następnie myć paski bez inkubacji pośredniej **3 x** przy pomocy każdorazowo 1,5 ml **wody destylowanej lub wody dejonizowanej**.
15. Odlać wodę destylowaną /wodę dejonizowaną/, po czym suszyć paski na czystym zdołnym do wysysania płynu papierze /bibule/. Zabarwienie tła /podłoża/, które można zaobserwować w odniesieniu do wilgotnych pasków testowych nitrocelulozowych, znika zupełnie w przypadku pasków suszonych. Wzmocnione paski testowe nitrocelulozowe wymagają w porównaniu do konwencjonalnych pasków testowych nitrocelulozowych nieco więcej czasu do zupełnego ich wyschnięcia.
16. Celem sporządzenia oceny wykorzystać dołączony protokół oceny. Opisy i napisy szczegółowe na karcie protokołowej ugotowi Państwu ocenę próbek pacjentów.

Schemat przebiegu testu - zobacz strona ostatnia

8.4 Zastosowanie procesorów Immunoblot

Do zautomatyzowanego przetwarzania testów Blot i LINE walidowane są następujące urządzenia: Apollo i Profiblot. Zasadniczo nadajemy wszystkie dostępne w handlu automaty Blot.

9. Ocena wyników badania

Dla dokonania bezpiecznej i pewnej oceny kaŹdy z pasków LINE wyposażony jest w dwie kontrole:

1. **Kontrola surowicy** (= serum control): Jedynie po inkubacji z obecnoŹciŹ surowicy pacjentów ukazuje siŹ pod liniŹ oznakowanŹ/=/ markline/ pasmo inkubacyjne surowicy.
2. **Kontrola koniugatu** (= conjugate control): Pasek LINE jest wyposażony w pasmo kontrolne koniugatu, które pojawia siŹ po inkubacji z odpowiednim koniugatem.

Przeprowadzenie testu jest udane /dosŹ aktualne/, gdy na rozwiniŹtym pasku testowym nitrocelulozowym moŹna rozpoznaŹ w sposób wyraŹny zarŹwno kontrolŹ surowicy, jak równieŹ i wewnŹtrznŹ kontrolŹ koniugatu. PozycjŹ paska kontrolnego surowicy oraz paska kontrolnego koniugatu znajdziecie PaŹstwo w karcie protokoŹu.

9.1 Ocena próbek pacjentów

PozycjŹ oraz okreŹlenie pasm kontrolnych znajdziecie PaŹstwo w karcie protokoŹu.

Pasmo IgM: OspC, VlsE-Mix, p39 oraz pasmo EBV do tzw. diagnostyki wykluczajŹcej

Pasmo IgG: VlsE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) i pasmo TpN17 do diagnostyki wykluczajŹcej (tylko przy WE 223G)

9.2 Zastosowanie kontroli typu Cut off

Pasm, których intensywnoŹ jest sŹabsza od pasm Cut off kontroli typu Cut off nie naleŹy wciŹgaŹ do procesu oceny.

Pasmo IgM Cut off : OspC

Pasmo IgG Cut off: VlsE-Mix

9.3 Znaczenie antygenów

Wykaz wykorzystanych wysoko oczyszczonych (OspC) i rekombinowanych (VlsE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 i pG) antygenów *Borrelia burgdorferi*, antygen EBV-Viral Capsid Antigen gp125 i antygen TpN17. VlsE-Mix skŹada siŹ z dwŹch antygenów zrekombinowanych gatunku genomowego *Borrelia burgdorferi* s. s. i *Borrelia garinii*.

Antygen/ nazwa	Znaczenie antygenów	SwoistoŹ przeciwciaŹw LINE	Szczepy pierwotne/oczysz- czanie
OspC (p23), oczyszczony natywny antygen	Outer surface-protein C. Lipoproteina kodowana przez plazmidy (6, 22, 26, 28). WaŹny marker manifestacji wczesnej boreliozy z Lyme w badaniach serologicznych IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). <u>Znaczenie biologiczne:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. wymaga przypuszczalnie OspC do skutecznego poczynŹkowego zakaŹenia ssaka-gospodarza (46, 47, 48, 49). Do ekspresji OspC przez krŹtki dochodzi podczas wysysania krwi przez kleszcza i wczesnej fazy zakaŹenia ssaka-gospodarza (46). Po przeniesieniu krŹtkŹ na ssaka dochodzi do ponownego zmniejszenia ekspresji OspC. Wydaje siŹ, Źe lipoproteina nie jest konieczna do trwaŹego zakaŹenia (47, 47). Tilly i wsp. przypuszczajŹ Źe OspC podczas wczesnej fazy zakaŹenia ssaka-gospodarza uniemoŹliwiajŹ fagocytozŹ krŹtkŹ (50).	SwoistoŹ (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej ludzkim rumieniem wŹdruŹnym (Erythema migrans) w Niemczech/oczysz- czone poprzez preparacyjne SDS- Page
VlsE, rekombinowane	Variable major protein like sequence E. Lipoproteina <i>B. burgdorferi</i> z ekspresjŹ <i>in vivo</i> , wykazujŹca zachowane epitopy o duŹej immunogennoŹci, wykraczajŹce poza genogatunki. W badaniach serologicznych IgM reaktywnoŹ na VlsE obserwowana jest zwŹszcza w surowicach pacjentŹ ze wczesnymi boreliozami z Lyme. W badaniach serologicznych IgG reaktywnoŹ na VlsE obserwowana jest w surowicach pacjentŹ ze wczesnymi i zaawansowanymi boreliozami z Lyme. VlsE jest w badaniach serologicznych IgG markerem boreliozy z Lyme w rŹŹnych stadiach choroby. VlsE jest antygenem o 35 kDa, kodowanym na lp28-1 (2). <u>Znaczenie biologiczne:</u>	swoistoŹ	<i>B. burgdorferi</i> B31 (pierwotnie wyizolowane z zakaŹnego kleszcza na Shelter Island, N. Y.), <i>B. garinii</i> IP90 (pierwotnie wyizolowane z zakaŹnego kleszcza w Rosji) /

	<i>B. burgdorferi</i> s.l. może przetrwać u zakażonych ssaków mimo aktywnej odpowiedzi odpornościowej. Przypuszcza się, że kombinacyjna zmienność antygenowa białka powierzchniowego VlsE przyczynia się do tej przetrwalności jako mechanizm "immune escape" (51, 52, 53).		oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
p39 (BmpA), rekombinowane	Borrelial membrane protein A. Kodowany chromosomalnie (6, 19), kluczowy marker w badaniach serologicznych IgG rozsianych zakażeń boreliozy z Lyme (4, 8, 18). Proteiny Bmp są lipoproteinami o nieznanej funkcji.	duża swoistość (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKO (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej ludzkim rumieniem wędrującym (Erythema migrans) w Niemczech/oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
p83/100, rekombinowane	Chromosomalnie kodowany, związany z cylindrem protoplazmatycznym antygen (12, 13), zachowany w <i>B. burgdorferi</i> s. l. (17). Kluczowy marker boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium (8, 24, 29) w badaniach serologicznych IgG.	duża swoistość (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	<i>B. afzelii</i> PKO (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej ludzkim rumieniem wędrującym (Erythema migrans) w Niemczech/oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
BBA36 (iv1)*, rekombinowane	Antygen <i>B. burgdorferi</i> z ekspresją <i>in vivo</i> i 22 kDa, kodowany na lp54. BBA36 wykazuje zachowane epitopy o dużej immunogenności, wykraczające poza genogatunki. BBA36 jest ważnym markerem boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium (zakażenia rozsiane) w badaniach serologicznych IgG (10).	duża swoistość	<i>B. afzelii</i> MMS (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza z Niemiec)/oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
BBO323 (iv2)*, rekombinowane	Antygen <i>B. burgdorferi</i> z ekspresją <i>in vivo</i> i 42 kDa, kodowany chromosomalnie. BBO323 wykazuje zachowane epitopy o dużej immunogenności, wykraczające poza genogatunki. BBO323 jest ważnym markerem boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium (zakażenia rozsiane) w badaniach serologicznych IgG. (54)	swoistość	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza z Niemiec)/

			oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
Crasp3 (iv3)*, rekombinowane	Complement regulator-acquiring surface protein3. Antygen powierzchniowy <i>B. burgdorferi</i> z ekspresją <i>in vivo</i> i 21 kDa, kodowany na cp32-8. Należy do rodziny Erp. Ważny marker boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium (zakażenia rozsiane) w badaniach serologicznych IgG. Crasp3 wspiera oporność komplementarną (11, 54).	duża swoistość	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza z Niemiec)/ oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
pG (iv4)*, rekombinowane	Antygen <i>B. burgdorferi</i> z ekspresją <i>in vivo</i> i 22 kDa, kodowany na cp32-3. Należy do rodziny Erp. Ważny marker boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium (zakażenia rozsiane) w badaniach serologicznych IgG (16).	duża swoistość	<i>B. burgdorferi</i> ZS7/ <i>B. afzelii</i> MMS (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza z Niemiec)/ oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
EBV VCA-gp125	Immunodominujący antygen kapsydu wirusa Epsteina Barra Epstein Barr Virus Capsid Antigen IgM przeciwko VCA-gp125 z reguły znikają kilka tygodni po zakażeniu EBV.	Marker o dużej swoistości w badaniach serologicznych IgM zakażenia pierwotnego EBV.	Oczyszczanie gp125 następuje z lizatu pełnych komórek (zakażone EBV komórki ludzkie) za pomocą chromatografii powinowactwa przy użyciu monoklonalnego przeciwciała przeciw gp125.
<i>Treponema pallidum</i> TpN17 rekombinowane (tylko przy WE223G)	Marker krwi pierwszorzędowej, drugorzędowej i utajonej.	duża swoistość dla wszystkich stadiów zakażenia	<i>Treponema pallidum</i> / oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA

*(iv1-4) = antygeny ulegające ekspresji *in vivo* (iv)

9.4 Kryteria oceny

Interpretacja serologicznych wyników powinna w każdym przypadku do analizy ogólnej włączyć obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz dalsze będące do dyspozycji badającego laboratoryjne wyniki badania i oględzin.

Polecana ocena zbiorcza (IgM + IgG) antygenów *Borrelia*

Dla pewnej diagnostyki w zakresie infekcji *Borrelia* procedurę LINE przeprowadza się naleŹy w odniesieniu do procedur IgG oraz IgM, po czym powinno się dokonać zbiorczej oceny i wydać zbiorcze orzeczenie.

Oceniane bŹdŹy pozytywnie jedynie te pasma, które wykazujŹy intensywnoŹi $\geq$ pasm typu cut off.

Pasma wystŹpujŹce w IgM		Pasma wystŹpujŹce w IgG	Ocena
Brak pasm lub iloŹi mniejsza < od pasm typu Cut off	lub	Brak pasm lub iloŹi mniejsza < od pasm typu Cut off lub 1 pasmo IgG (poza VlsE)	negatywna
1 pasmo IgM (poza OspC)	lub	Pasma VlsE IgG	wykazanie oceny granicznej
Pasma OspC IgM lub ≥ 2 pasma IgM	lub	≥ 2 pasma IgG	pozytywna
1 pasmo IgM	i	1 pasmo IgG	pozytywna (*)

- (*) Konstelacja pasm w wierszu oznakowanym kolorem szarym ukazuje kombinację tylko jednego pasma w procedurze IgM plus jedno pasmo w procedurze IgG, którŹy w trybie oceny zbiorczej /IgM + IgG/ ocenić naleŹy pozytywnie.

Polecana ocena w odniesieniu do pozytywnego EBV-gp125 w serologii IgM

W ramach pierwotnej infekcji EBV dojŹi moŹe w oparciu o poliklonalnŹy stymulację komórek B do aktywnoŹci przeciwciaŹ przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato (55). Wynik nŹ stŹd moŹe bŹdŹie pozytywna ocena boreliozy z Lyme. Celem zminimalizowania tego typu diagnoz faŹszywych VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot zawiera antygen Epstein Barr Viral Capsid gp125. JeŹi w serologii IgM i/lub IgG oprócz antygenów borelii reagujŹy równieŹ gp125 z intensywnoŹciŹ $\geq$ pasmo cut off IgM, naleŹy dla pewnoŹci sprawdzić równieŹ caŹkowity status EBV w surowicy (np. za pomocŹ testu VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; nr zam.: WE102G32/96 i VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot; nr zam.: WE102M32/96).

Pasmo **EBV-gp125** nie jest walidowane do stosowania w diagnostyce pŹny mózgowo-rdzeniowego.

Zalecana ocena pasma Tpn17

Pasmo antygenów *Treponema pallidum* Tpn17 (tylko WE223G)

Podczas diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme obserwowane sŹy reakcje krzyŹowe z innymi mikroorganizmami. WaŹnŹ rolę odgrywajŹy tu zakaŹenia wirusem opryszczki (zwŹszcza EBV) oraz bakteryjnie uwarunkowane choroby, takie jak kiŹa. Zalecenia dotyczŹce prawidŹowej diagnostyki boreliozy z Lyme Źyme-Borreliose MiQ12/2000sŹ nastŹpujŹce: Źw przypadku uzyskania granicznego lub pozytywnego wyniku testu przesiewowego (przyp.: diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme) naleŹy wykonać test przesiewowy w kierunku kiŹy, aby wykluczyć faŹszywie pozytywne wyniki wywoŹane reagujŹcymi krzyŹowo przeciwciaŹami skierowanymi przeciwko krŹtkom.

Pasmo Tpn17 sŹy do rozpoznania faŹszywie granicznych/pozytywnych wyników w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme wywoŹanych reagujŹcymi krzyŹowo przeciwciaŹami z powodu zakaŹenia *Treponema pallidum* (kiŹy).

JeŹi w teŹcie VIROTECH *Borrelia* in vivo + Tpn17 IgG LINE Immunoblot pasmo Tpn17 reaguje $\geq$ pasmo cut off IgG i równoczeŹnie antygeny borelii w IgM i/lub IgG, naleŹy dla pewnoŹci sprawdzić caŹkowity status kiŹy w surowicy (np. za pomocŹ

testu VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot nr zam.: WE150G16/32 i VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot nr zam.: WE150M16/32).

Należy bezwzględnie przestrzegać :

- Pasmo TpN17 nie może w odniesieniu do czułości i swoistości zastąpić całkowitej diagnozy różnicowej kiły.
- Negatywny wynik dla pasma antygenów TpN17 nie wyklucza zasadniczo możliwości występowania przeciwciał skierowanych przeciwko *Treponema pallidum*.
- Pozytywny wynik dla pasma antygenów TpN17 należy potwierdzić odpowiednimi testami dla *Treponema pallidum* (np. VIROTECH WE150).
- Pasmo TpN-17 nie jest walidowane do stosowania w diagnostyce pętna mózgowo-rdzeniowego.

Typowe zespoły czynników na siebie wzajemnie oddziałujących jako wynik badań

Kolejność antygenów na pasmach *Borrelia* in vivo LINE została w ten sposób wybrana, by antygeny (na przykład: OspC, VlsE-IgM, VlsE-IgG), które w sposób uprzywilejowany /na pierwszym miejscu/ reagują z przeciwciałami pacjentów z wczesnym stadium boreliozy z Lyme, znajdowały się w górnej części paska /blisko linii oznacznikowych/. Antygeny (na przykład: p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG), które w sposób uprzywilejowany /na pierwszym miejscu/ reagują z przeciwciałami pacjentów z zaawansowanymi stadiami boreliozy z Lyme, znajdują się w dolnej części paska /pasków/ /daleko od linii oznacznikowych/. Stąd już optyczna forma /dosł. wrażenie/ rozpozna pasm daje wskazówki i pogląd na stadium infekcji /zatem od wczesnego stadium boreliozy z Lyme do jej stadiów późniejszych/.

Przykłady częstych konstelacji pasm w odniesieniu do następujących stadiów infekcyjnych:

Stadium boreliozy	Serologia IgM	Serologia IgG
Wczesne boreliozy z Lyme	OspC	VlsE
	VlsE	VlsE
	p39	VlsE
	> 2 pasma	Ładnych lub VlsE
	OspC	Ładne
Rozsiane i rozproszone boreliozy z Lyme	Mogł nie wystąpić Ładne pasemka lub mogł wystąpić wszystkie pasemka IgM.	VlsE oraz p39
		2 pasemka
Zaawansowane boreliozy z Lyme	Pasma IgM przechodzą w swojej większości do tła /dosł. na plan drugi/.	Wraz z postępowaniem zaawansowania infekcji występuje zazwyczaj również coraz więcej pasm IgG w najróżniejszych ich kombinacjach: p39, p83, VlsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 oraz pG)

9.5 Granice testu

- Negatywny wynik testu Blot nie wyklucza całkowicie możliwości występowania zakażenia *B. burgdorferi* s.l. Próbkę mogła zostać pobrana przed wystąpieniem przeciwciał lub też miało przeciwciała leży poniżej granicy stwierdzenia-wykazywania testu.
- Leczenie pacjentów antybiotykami we wczesnym stadium schorzenia /35, 37/ prowadzi może do stłumienia/zatajenia odpowiedzi immunologicznej do tego stopnia, iż nie bądź mogły zostać wykazane/stwierdzone przeciwciała swoiste dla *anty-B. burgdorferi*.
- Reakcja krzyżowa pomiędzy *Borrelia* oraz innymi krótkami, prowadzi może do wystąpienia zasocjowanych z *Borrelia* pasm, co może ostatecznie doprowadzić do fałszywego pozytywnego wyniku. Surowice pacjentów z na przykład

następującymi - niżej podanymi - infekcjami mogły reagować w sposób krzyżowy: syfilis (*Treponema pallidum*), malinica, frambezia, jagodzica (*Treponema pertenue*), gorączka powrotna (*Borrelia spec.*), leptospiroza (*Leptospira spec.*) (38). Również w przypadku wirusów opryszczki (HSV, CMV, Parvovirus) dojść może do reakcji krzyżowych (34, 39). Jeśli w teście VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE223G) wykazywana jest oprócz reaktywności na antygeny boreliozy z Lyme również reaktywność na antygen TpN17, należy uwzględnić informacje podane w punkcie 9.4 (Zalecana ocena pasma TpN17).

4. W ramach pierwotnej infekcji w oparciu o poliklonalną stymulację komórek B dojść może do aktywności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Jeśli w teście VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot wykazywana jest oprócz reaktywności IgM i/lub IgG na antygeny borelii również reaktywność na EBV-gp125, konieczne jest wykluczenie mononukleozy poprzez przeprowadzenie diagnostyki różnicowej.
5. W rzadkich przypadkach surowice pacjentów wykazywały mogły również pasma /ciemne podłogi-, białe pasemka/, nie należy ich jednak oceniać, co oznacza iż Immunoblot nie jest w tych przypadkach możliwy do oceny. Surowica powinna w tym przypadku zostać przebadana przy pomocy innych serologicznych metod.

10. Literatura

1. Agüero-Rosenfeld et al., 1993 Diagnostyka serologiczna we wczesnym stadium borelii Lyme. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antygeniczne wariacje w borelii Lyme przy pomocy przypadkowej rekombinacji kolejnych kaset typu VMP; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Reaktywne krzyżowo białko *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Zachodnie immunowchłanianie w diagnostyce serologicznej borelii Lyme J. infect Dis. 176:392-400
5. Engstroem et al., 1995 Kryteria interpretacyjne immunowchłaniania dla diagnostyki serologicznej wczesnego stadium borelii Lyme. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Wykrywanie przeciwciał dla rekombinantu P39 białka *Borrelia burgdorferi* przy użyciu enzymatycznego testu immunologicznego i immunowchłaniania. J. Rheumatol. 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Standardy jakościowe diagnostyce mikrobiologiczno-infekcyjnej dla lim-boreliozy, strona 38 i dalsze, Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Kryteria interpretacyjne dla standardowych zachodnich plam dla trzech europejskich gatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analiza odpowiedzi ludzkiego przeciwciała na zewnętrzne powierzchniowe białko C (OspC) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* i *B. afzelii*. Med. Microbiol. Immunol. 185:121-129
10. Wallich, R. et al.; Rejestry sztucznej infekcji pozwalają na wykrycie immunologiczne nowych antygenów *Borrelia burgdorferi* jako kandydatów na szczepionkę przeciwko borelii Lyme; Eur. J. Immunol. 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immunologiczne obejście *Borrelia burgdorferi*: mapowanie uzupełniającego czynnika inhibitora strona wiązania H dla BbCRASP-3, nowy członek rodziny białka Erp; Eur. J. Immunol. 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 Antygen 83-kilodaltonowy *Borrelia burgdorferi* który stymuluje odpowiedzi immunoglobuliny M (IgM) oraz IgG u zainfekowanych gospodarzy jest wyrażony przez gen chromosomowy. Clin. Microbiol. 28:1673-1676
13. Luft et al., 1992 Białko 93-kilodaltonowe *Borrelia burgdorferi*: immunodominujący antygen protoplazmatyczny cylindryczny. Infect. Immun. 60:4309-4321
14. Ma et al., 1992 Diagnostyka serologiczna boreliozy Lyme za pomocą immunowchłaniania: reaktywność różnych znaczących przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30:370-376
15. Moskopidhis et al., 1995 Wartościowość Immunoblot w diagnostyce surowicy lim-boreliozy, lab. Med. 19:231-237
16. Wallich, R. et al.; Molekularne klonowanie i immunologiczna charakteryzacja nowego liniowego-zakodowanego w plazmidzie genu, pG, *Borrelia burgdorferi* wyrażonego tylko in vivo; Infection and Immunity 1995 Sept:3327-3335
17. Roessler et al., 1995 Molekularna i immunologiczna charakteryzacja białka p83/100 różnych izolatów *Borrelia burgdorferi* sensu lato Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
18. Roessler et al., 1997 Różnorodność BmpA (P39) wśród europejskich izolatów *Borrelia burgdorferi* sensu lato oraz wpływ różnorodności międzygatunków na diagnostykę serologiczną J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
19. Simpson et. al., 1990 Reaktywność serum ludzkiej borelii Lyme z 39-kilodaltonowym antygenem specyficznym dla *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
20. RKI (1999), Poradnik w chorobach infekcyjnych, lim-borelioza, Biuletyn Epidemiologiczny, wydanie przepracowane

21. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Odpowiedź przeciwciał w borelii Lyme: ocena testów diagnostycznych, J. Inf. Dis. 149:789-95
22. Wilske et al., 1986 Immunochemiczna i immunologiczna analiza europejskich szczepów *Borrelia burgdorferi*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
23. Dressler, F. (1994) Borelia Lyme u europejskich dzieci i dorosłych, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
24. Wilske et al., 1988 Immunologiczno-chemiczna analiza odpowiedzi immunologicznej w późnych manifestacjach lim-boreliozy, Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
25. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Borelia Lyme: podstawowe aspekty naukowe i kliniczne, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
26. Wilske & Preac-Mursic 1993 Mikrobiologiczna diagnoza borelii Lyme w: Aspekty borelii Lyme: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
27. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994), Odpowiedzi przeciwciała na trzy genomiczne grupy *Borrelia burgdorferi* w europejskiej borelii Lyme, J. Infect. Dis. 169: 313-318
28. Wilske et al., 1993 Immunologiczny i molekularny polimorfizm OspC, immunodominujące główne zewnętrzno powierzchniowe białko *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 61:2182-2191
29. Wilske et al., 1994 Immunowchłanianie przy użyciu rekombinantów antygenów pochodzących od różnych genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
30. Wilske, 1995 Diagnostyka infekcji *Borrelia burgdorferi*. Internista 36:114-119
31. Wilske et al., 1997 Boreliozy, Biblioteka Diagnostyczna, 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Ścisłość zachodnich modeli immunowchłaniania w diagnozie serologicznej borelii Lyme, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
33. Oschmann i Kraiczy, (1998), Lim-borelioza oraz wczesnowiosenne zapalenie mózgu i opon mózgowych wywołane przez Arbowirusy, Wydawnictwo UNI-MED
34. Horst, H. (1997), Rodzima borelioza spowodowana ukłóśnieniem kleszcza /choroba lim/ u człowieka i u zwierzęcia, 3., Wydanie przepracowane, Wydawnictwo Spitta: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Przeprowadzanie i interpretacja testów serologicznych w przypadku podejrzenia o infekcję Boreliozy, Clin. Lab. 44: 897-902
36. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antygeny *Borrelia burgdorferi* rozpoznane podczas borelii Lyme. Pojawienie się odpowiedzi nowej immunoglobuliny M oraz ekspansja immunoglobuliny G później w trakcie choroby., J. Clin. Invest. 78: 934-39
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnozowanie wczesnego stadium borelii Lyme. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Reaktywność krzyżowa w testach serologicznych dla borelii Lyme i innych infekcjach krętkowych. J. Infect. Dis. 156: 183-88
39. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Infekcje wirusem Epstein-Barr i wirusem cytomegalii dają fałszywe pozytywne wyniki w dwu-testowym protokole IgM dla wczesnego stadium borelii Lyme, Infection 27 No.3: 231
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Borelia Lyme - odkleszczowa krętkowica?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Borelia Lyme, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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.
46. 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

47. 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
48. 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
49. 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
50. 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
51. 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
52. 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
53. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
54. Nowalk et al. (2006), Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins, Infection and Immunity 74, No.7: 3864-3873
55. Poggensee, G. et al (2008), Lyme.Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze, Bundesgesundheitsblatt 50: 1329-1339

11. Symbole



Zobacz - instrukcja obsługi!

12. Schemat przebiegu testu

Przeprowadzanie testu w formie skróconej:

Inkubacja próbek	30 minut	15 µl surowicy/osocza pacjenta / 100 µl kontrola w kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹzajŹcego
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹzajŹcego
Inkubacja koniugatu	30 minut	Z obecnoŒciŹ 1,5 ml roztworu uŹytkowego (1 + 100)
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml Œrodka myjnego buforowego rozcieŹzajŹcego
	1 x 1 minuta	Z obecnoŒciŹ wody destylowanej lub dejonizowanej
Inkubacja substratu	10 ± 3 minut	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo 1,5 ml roztworu substratu
Zatrzymywanie	3 x bez fazy poŒredniej inkubowania	Z obecnoŒciŹ kaŹdorazowo Mit je 1,5 ml wody destylowanej lub wody dejonizowanej

Tabela rozcieŹzania koniugatu: /wartoŒci zaokrŹglone/ Ko:

Liczba pasków	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Œrodek myjny buforowy rozcieŹzajŹcy	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrat koniugatu	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
PojemnoŒi koŹcowa	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Liczba pasków	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Œrodek myjny buforowy rozcieŹzajŹcy	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrat koniugatu	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
PojemnoŒi koŹcowa	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Liczba pasków	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Œrodek myjny buforowy rozcieŹzajŹcy	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrat koniugatu	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
PojemnoŒi koŹcowa	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Liczba pasków	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Œrodek myjny buforowy rozcieŹzajŹcy	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrat koniugatu	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
PojemnoŒi koŹcowa	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml