

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

Objednací | číslo : WE222G32; WE222G96

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

Objednací | číslo : WE222M32; WE222M96

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

Objednací | číslo : WE223G32; WE223G96

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

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



Freigabedatum: 20.6.2018

REV 31 / VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot CZ

Obsah

1. Účel použití	3
2. Princip testu.....	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Souprava pro 32 analýz	3
3.2 Souprava pro 96 analýz	3
4. Přečtování a použitelnost testovacích souprav a reagensů	3
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Dodatečný potřebný materiál (není dodáván součástí)	4
7. Vyžadovaný materiál.....	4
8. Provedení testu.....	5
8.1 Příprava vzorků	5
8.2 Příprava reagensů	5
8.3 Provedení testu Immunoblot	5
8.4 Použití analyzátoru Immunoblot.....	6
9. Vyhodnocení testu.....	6
9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů	6
9.2 Použití hraniční kontroly Cut off	6
9.3 Význam antigenů	7
9.4 Kritéria vyhodnocení.....	9
9.5 Omezení testu	10
10. Literatura.....	11
11. Schéma provedení testu.....	14

1. Účel použití

Testovací souprava (kit) LINE Immunoblot slouží ke kvalitativnímu prokázání *B. burgdorferi* sensu lato specifických protilátek třídy IgG, popř. třídy IgM v lidském séru.

Vedle použití v sérologické diagnostice Lymeské-borreliosis je IgG Line Immunoblot vhodný pro použití v likvorové diagnostice neuroborreliosis. Pro použití v likvorové diagnostice si vyžádejte zvláštní pracovní návod.

2. Princip testu

Antigeny přivodce se přenášejí speciální rozprašovací metodou na nitrocelulóзовou membránu. Nitrocelulóзовá membrána je potom rozstřihána na jednotlivé proučky.

Inkubace nitrocelulóзовých proučků nesoucích antigen se vzorky lidského séra/plazmy umožňuje prokázat stávající specifické protilátky. Po odstranění nenavázaných protilátek promytím jsou jednotlivé nitrocelulóзовé proučky inkubovány s alkalickou fosfatázou konjugovanou s protilátkami proti lidským IgG popř. IgM. Po odstranění nenavázaného konjugátu promytím zviditelní se vytvořené imunokomplexy antigen-protilátka reakcí se substrátem, který působením enzymu vytváří modrofialový zbarvené proučky v místě lokalizace imunokomplexu. Reakce enzym-substrát se zastaví promytím nitrocelulóзовých proučků destilovanou vodou / deionizovanou vodou. Podle vytvořeného spektra pásků na membráně, odpovídajících jednotlivým antigenům lze usuzovat na přítomnost specifických protilátek třídy IgG popř. IgM proti těmto antigenům.

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

- | | | |
|---|-----------|-------------------|
| 1. IgG popř. IgM Nitrocelulóзовé testovací proučky s antigeny, zesílené fólií, setříděné v sáčku, připravené k použití | 1x | 32 proučků |
| 2. Kontrola hraní ní (cutoff) IgG popř. IgM, lidské sérum, předem zředěný | 1x | 1,0 ml |
| 3. Ředící roztok/promývací pufr , pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris | 2x | 50 ml |
| 4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s kozí protilátkou proti lidským IgG nebo IgM (100 x konc.) s konzervačním prostředkem | 1x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití | 1x | 57 ml |
| 6. Protokolovací list k záznamům a archivování výsledků | 1x | 1 kus |

3.2 Souprava pro 96 analýz

- | | | |
|---|-----------|-------------------|
| 1. IgG popř. IgM Nitrocelulóзовé testovací proučky s antigeny, zesílené fólií, setříděné v sáčku, připravené k použití | 3x | 32 proučků |
| 2. Kontrola hraní ní (cutoff) IgG popř. IgM, lidské sérum, předem zředěný | 2x | 1,0 ml |
| 3. Ředící roztok/promývací pufr , pH 7,3 (10x konc.), s konzervačním prostředkem a Tris | 4x | 50 ml |
| 4. Konjugát alkalická fosfatáza konjugovaná s kozí protilátkou proti lidským IgG nebo IgM (100 x konc.) s konzervačním prostředkem | 3x | 0,7 ml |
| 5. Substrát (BCIP/NBT), připravený k použití | 3x | 57 ml |
| 6. Protokolovací list k záznamům a archivování výsledků | 3x | 1 kus |

K dodání na vyžádání:

IgG, popř. IgM- pozitivní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Vyhodnocení pozitivní pruhy $\geq$ pruhy Cut off můžete zjistit z certifikátu, který je součástí dodávky.

(obj.-č.: IgG: WE222P60 / WE223P60, popř. IgM: WE222P80)

IgG/IgM- negativní kontrola, lidské sérum, předem zředěný, 0,5 ml.

Negativní kontrola nezobrazuje žádné pruhy, resp. žádné vyhodnocení relevantní pruhy $\geq$ pruhy Cut off.

(obj.-č.: IgG/IgM: WE222N10 popř. WE223N60)

4. Pěchování a použitelnost testovacích souprav a reagentů

Testovací soupravu pěchovávejte při 2 až 8°C. Působitelnost jednotlivých složek je vyznačena na jejich štítcích, použitelnost soupravy (datum expirace- viz příslušný certifikát o kontrole kvality).

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmrznout a nevystavujte je vysokým teplotám.
2. Reagensie nepoužívejte po uplynutí jejich data upotřebitelnosti.
3. Neponechávejte reagensie na přímém světle.
4. Roztok substrátu BCIP/ NBT je citlivý na světlo a musí být přechováván ve tmě.
5. **Nitrocelulózové testovací proučky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými proučky opatrně uzavřete a přechovávejte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulózové testovací proučky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezemřelý	+2 až +8°C	1 týden
testovací proučky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v souladu s dodaným sáčkem)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zemřelý	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
	po zemřelí (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zemřelí (připravený k použití)	nebo pokojová teplota	2 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

1. Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a sledována negativně na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by mělo být kontrolní séra, vzorky, zemřelé vzorky, konjugáty a nitro-celulózové testovací proučky považována za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce v laboratořích..
2. Při provádění imunoblotu je třeba používat jednorázové rukavice a pinzetu z umělé hmoty.
3. Likvidace použitého materiálu se uskutečňuje podle specifických směrnic platných v konkrétní zemi použití.
4. Inkubační vaničky jsou výrobcem koncipovány pouze pro jedno použití. Vícenásobné použití těchto inkubačních vaniček je na zodpovědnost uživatele. Při event. vícenásobném použití doporučujeme inkubační vaničky po použití několik hodin dezinfikovat v 1% roztoku chlornanu sodného, potom vyčistit a důkladně vypláchnout vodou z vodovodu a destilovanou/demineralizovanou vodou.

6. Dodatečný potřebný materiál (není dodáván součástí)

1. Inkubační vaničky (v případě potřeby lze objednat pod objednacím číslem WE300.08)
2. Vertikální stojánek, případně naklápním (ne rotací!)
3. Promývací láhev
4. Pipeta nebo ruční promývačka
5. Mikropipety 5 µl - 1500 µl
6. Čistítko mikropipety
7. Zkumavky na vzorky objemu 2 - 20 ml
8. Pinzeta z umělé hmoty
9. Destilovaná voda nebo deionizovaná voda
10. Filtrální papír

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulantů), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum. Pro použití likvoru, viz zvláštní návod k použití Liquor LINE.

8. Provedení testu

Pro dosažení správných výsledků se musí přesně dodržovat pracovní předpis firmy VIROTECH Diagnostics.

8.1 Příprava vzorků

1. Na vzorek pacienta je zapotřebí 15 µl séra nebo plazmy. Při zpracování likvoru/séra je třeba použít zvláště, individuálně vypočtené množství likvidu/séra na těsdu Ig (viz návod k použití Liquor LINE).
2. Vzorky krve by měly být odebírány asepticky venepunkcí. Po úplné koagulaci je třeba sérum oddělit (u plazmy odpadá). Pro delší přechovávání musí být séra zmrazena na - 20°C.
3. Séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat.
4. Séra, která byla tepelně inaktivována nebo jsou lipemicky, hemolyticky nebo mikrobiálně kontaminována mohou vést k chybným výsledkům a neměla by být proto používána.
5. Nepoužívejte zakalená séra (zejména po roztání pokud byla zmražená), popřípadě se zákal odstraní centrifugováním (5 minut při 1000 x g), který supernatant odpipetujete a použijte při testu.

8.2 Příprava reagentů

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE a EcoBlot v jednom testovacím cyklu se stejnými podmínkami inkubace a komponenty různých parametrů z různých řad. Cut off kontroly se provádí podle parametrů a řady.
2. Před zředěním koncentrovaných reagentů se musí vytemperovat na teplotu místnosti. Používejte pouze destilovanou vodu / deionizovanou vodu vysoké kvality a pracujte při teplotě místnosti.
3. Zředěné roztoky před použitím dobře promíchejte.
4. **Zředěný / promývací pufr**
Ředící roztok/promývací pufr je k dispozici v 10ti násobné koncentraci. Ředící roztok/promývací pufr se ředí v poměru 1:10 destilovanou nebo deionizovanou vodou (10ml/50ml/100ml koncentrátu + 90ml/450ml/900ml A. dest./deioniz.), dobře promíchat.
Koncentrovaný i naředěný ředící/promývací pufr může vykazovat žluté zabarvení. Toto žluté zabarvení však nemá žádný vliv na trvanlivost a funkci ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgM**
Konjugát 1 + 100 naředěte finálním zředěným zředěným / promývacím pufr a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředění konjugátu (bod: Schéma přiblíhu testu).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití.

8.3 Provedení testu Immunoblot

Pozor : Nitrocelulózové testovací proužky smí být testovány pouze ve schválené (povolené) těsdu Ig (viz etiketu na šítku Blot a označení na každém jednotlivém testovacím proužku).

Pro správné provedení a posouzení *Borrelia in vivo* LINE musí být při každém testu součástí provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a řad.

**Pro spolehlivou diagnostiku borrelií by mělo být v testu LINE
proveden přikaz protilátek těsdu IgG a IgM**

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom proužku do hlábků čisté inkubační vaničky. Proužky se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředěný / promývací pufr** a vložte na těsdu ku.. Dbejte na to, aby nitrocelulózové testovací proužky byly kapalinou pokryty stejnou měrou. Proužky nesmí během celého provádění testu oschnout.
4. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky se během minuty zcela navlhčí a mohou být inkubovány v poloze zadní stranou dolů, přední stranou dolů nebo v poloze na stranu.

5. Na každých **15µl séra/plazmy pacienta** i **100µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na **těpalce**. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci ostatních vzorků.
6. Zcela odsajte kapalinu ze **lábků** nebo opatrně odlijte. Při odlévání kapaliny zůstane na nitrocelulózové testovací proužky ulpěná na dně **lábků**. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z **nasledujícího** promývacího pufru na **těpalce**. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství **prvního následujícího** konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **lábků** (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **následujícího konjugátu** do **lábků** s proužky a inkubujte **30 minut** na **těpalce**.
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **lábků**.
11. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z **nasledujícího** promývacího pufru na **těpalce**. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze **lábků** (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do **lábků** a nechte vyvíjet zbarvení na **těpalce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odlitím roztoku substrátu. Dále promyjte proužky bez meziinkubace **3 x** vždy 1,5 ml **destilované nebo deionizované vody**.
15. Odlijte destilovanou nebo deionizovanou vodu a nechte proužky oschnout na **istém** filtračním papíře. Zabarvení pozadí, které lze pozorovat u vlhkých nitrocelulózových testovacích proužků, se u oschlých proužků zcela ztrácí. Zesílené nitrocelulózové testovací proužky vyžadují v porovnání s obvyklými nitrocelulózovými testovacími proužky trochu více času, než oschnou.
16. Pro vyhodnocení používejte **připojený** vyhodnocovací protokol. Popis jednotlivých proužků na protokolu a **přímě** na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátoru Immunoblot

Pro automatické zpracování Blot a LINE jsou schváleny tyto přístroje: Apollo a Profiblot. V zásadě jsou vhodné všechny automaty Blot obvyklé na trhu.

9. Vyhodnocení testu

Je spolehlivému vyhodnocení je každý z proužků LINE vybaven dvěma kontrolami :

1. kontrolou séra

Pouze po inkubaci se sérem pacienta se pod označovací linií objeví pruh inkubace séra.

2. kontrolou konjugátu

Pásek LINE je vybaven kontrolním pásem konjugátu, který se zobrazí po inkubaci s odpovídajícím konjugátem.

Provedení testu je platné, pokud je na vyvolaných nitrocelulózových proužcích **zřetelně** rozeznatelná jak kontrola séra tak i interní kontrola konjugátu.

Polohu kontrolního pásu séra a konjugátu najdete na protokolu..

9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů

Polohu a označení reakčních proužků zjistíte v protokolovacím listu.

pruhy IgM: OspC, VlsE-Mix, p39 a jeden pruh EBV k vylučovací diagnostice

pruhy IgG: VlsE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) a pruhy TpN17 k vylučovací diagnostice (jen u WE 223G)

9.2 Použití hraniční kontroly Cut off

Pruhy, jejichž intenzita je slabší než pruhu Cut off kontroly Cut off, nejsou do hodnocení zahrnovány.

Pruhy IgM Cut off: OspC

Pruhy IgG Cut off: VlsE-Mix

9.3 Význam antigenů

Soupis použitých vysoce oříděných (OspC) a rekombinantních antigenů (VlsE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 a pG) *Borrelia burgdorferi*, antigen EBV-Viral Capsid antigen gp125 a antigen TpN17. Směs VlsE-Mix se skládá ze dvou rekombinantních antigenů genospeciés *Borrelia burgdorferi* s. s. a *Borrelia garinii*.

Antigen/ Charakteristika	Význam antigenů	Specifická proti látka v LINII	Průvodní kmeny/izolace
OspC (p23), purifikovaný nativní antigen	Outer surface-protein C. Plasmidem kódovaný lipoprotein (6, 22, 26, 28). Důležitý marker různých projevů lymeské boreliózy v sérologii IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). <u>Biologický význam:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. zejména potřebuje OspC pro úspěšnou penetraci do hostitele (46, 47, 48, 49). Spirochety exprimující OspC v krevní směsi v klíčově a v rané fázi infekce savčího hostitele (46). Po přechodu spirochet savci je exprese OspC opět down-regulována. Pro přetrvávající infekci se lipoprotein nezdá být nezbytný (47, 47). Tilly a kol. se domnívají, že OspC v rané fázi infekce savčího hostitele zabraňuje fagocytóze spirochet (50).	Specifický (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKO (průvodní izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno preparativní SDS-Page
VlsE, rekombinantní	Variable major protein like sequence E. <i>In vivo</i> exprimovaný <i>B. burgdorferi</i> lipoprotein, který vykazuje konzervované, genospecie určující, vysoce imunogenní epitopy. V sérologii IgM budou pozorovány reaktivity proti VlsE, zejména u sér od pacientů s raným stádiem lymeské boreliózy. V sérologii IgG budou pozorovány reaktivity proti VlsE, u sér od pacientů s raným a pokročilým stádiem lymeské boreliózy. VlsE působí v sérologii IgG jako marker přecházejícího stádia onemocnění lymeské boreliózy. VlsE je antigen 35 kDa kódovaný na lp28-1 (2). <u>Biologický význam:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. může přetrvávat v infikovaných kojcích i přes aktivní imunitní odpověď. Předpokládá se, že kombinací antigenní variace povrchového proteinu VlsE - jako mechanismu imunitní escape - přispívá k této perzistenci (51, 52, 53).	Specifický	<i>B. burgdorferi</i> B31 (průvodní izolován od infikovaného klíštěte izolovaného na ostrově Shelter Island, N. Y.), <i>B. garinii</i> IP90 (průvodní izolován od infikovaného klíštěte izolovaného Rusku) / Purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
p39 (BmpA), rekombinantní	Boreliální membránový protein A. Chromozomálně kódovaný (6, 19), centrální marker v sérologii IgG pro diseminované infekce lymeské boreliózy (4, 8, 18). Proteiny Bmp jsou lipoproteiny s neznámou funkcí.	Vysoce specifické (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKO (průvodní izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
p83/100, rekombinantní	Chromozomálně kódovaný, protoplazmatický cylin dr asociovaný antigen (12, 13), který se udržuje uvnitř <i>B. burgdorferi</i> s. l. (17). Centrální marker v sérologii IgG pro pokročilé lymeské boreliózy (8, 24, 29).	Vysoce specifické (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	<i>B. afzelii</i> PKO (průvodní izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie)

BBA36 (iv1)*, rekombinantní	<i>In vivo</i> antigen <i>B. burgdorferi</i> 22 kDa kódovaný na lp54. BBA36 vykazuje konzervované, genospecie určující, vysoce imunogenní epitopy. BBA36 je důležitý marker pro pokročilou lymeskou boreliózu (diseminované infekce) v sérologii IgG (10).	Vysoce specifické	<i>B. afzelii</i> MMS (převodně izolován z infikovaného klíštěte v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
BBO323 (iv2)*, rekombinantní	<i>In vivo</i> exprimovaný antigen <i>B. burgdorferi</i> 42 kDa kódovaný chromozomálně BBO323 vykazuje konzervované, genospecie určující, vysoce imunogenní epitopy. BBO323 je důležitý marker pro pokročilou lymeskou boreliózu (diseminované infekce) v sérologii IgG. (54)	Specifický	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (převodně izolován z infikovaného klíštěte v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
Crasp3 (iv3)*, rekombinantní	Complement regulator-acquiring surface protein3. <i>In vivo</i> exprimovaný povrchový antigen <i>B. burgdorferi</i> 21 kDa kódovaný na cp32-8. Člen rodiny Erp. Důležitý marker pro pokročilou lymeskou boreliózu (diseminované infekce) v sérologii IgG. Crasp3 podporuje rezistenci komplementu (11, 54).	Vysoce specifické	<i>B. burgdorferi</i> ZS7 (převodně izolován z infikovaného klíštěte v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
pG (iv4)*, rekombinantní	<i>In vivo</i> antigen <i>B. burgdorferi</i> 22 kDa kódovaný na cp32-3. Člen rodiny Erp. Důležitý marker pro pokročilou lymeskou boreliózu (diseminované infekce) v sérologii IgG (16).	Vysoce specifické	<i>B. burgdorferi</i> ZS7/ <i>B. afzelii</i> MMS (převodně izolován z infikovaného klíštěte v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
EBV VCA-gp125	Dominantní imunitní vir Epstein-Barrův Antigen (virový kapsidový antigen). Protilátky IgM proti VCA gp125 zmizí zpravidla několik týdnů po infekci EBV.	Vysoce specifický marker v sérologii IgM-pro primární infekce EBV	Purifikace gp125 se provádí z lyzátu celých buněk (lidské buňky infikované EBV) pomocí afinitní chromatografie za použití monoklonální

			protilátky anti-gp125
Treponema pallidum TpN17 rekombinantní (pouze u WE223G)	Marker pro primární, sekundární a latentní syfilis	vysoce specifické pro všechny fáze infekce	<i>Treponema pallidum</i> / Purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie

*(iv1-4) = in vivo (iv) exprimované antigeny

9.4 Kritéria vyhodnocení

Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologické údaje a další laboratorní nálezy, které jsou k dispozici.

Doporužené celkové posouzení (IgM + IgG) borreliálních antigenů

K bezpečné diagnostice infekce Borrelie by měla být LINE realizována v IgG a IgM a tyto společně hodnoteny.

Jako pozitivní jsou vyhodnocovány pouze pruhy, jejichž intenzita je $\geq$ než intenzita pruhu Cut off.

Pásek(pásky) vyskytující se v IgM		Pásek(pásky) vyskytující se v IgG	Posouzení
Bez pásky event. < Cut off pásek	nebo	Bez pásky event. < Cut off pásek nebo 1 IgG pásek (kromě VlsE)	Negativní
1 IgM pásek (kromě OspC)	nebo	VlsE IgG pásek	Hraniční
OspC IgM pásek nebo ≥ 2 IgM pásky	nebo	≥ 2 IgG pásky	Pozitivní
1 IgM pásek	a	1 IgG pásek	Pozitivní (*)

- (*) Konstelace pásky v řádku se šedým pozadím ukazuje kombinaci jen jednoho pásku v IgM plus jednoho pásku v IgG, který je nutno v souhrnném posuzování (IgM+IgG) hodnotit jako pozitivní.

Doporužené posuzování pš pozitivním EBV-gp125 v sérologii IgM

V rámci primární infekce viru EBV může z důvodu polyklonální stimulace buněk B docházet k reakcím protilátek proti antigenům *Borrelia burgdorferi* (55). Z toho může vyplynout nesprávný pozitivní nález lymské borreliózy. Aby byly takovéto nesprávné diagnózy minimalizovány, obsahuje test VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot antigen Epstein Barr Viral Capsid gp125. Reagují-li v serologii IgM a/nebo IgG kromě antigenů borrelie i gp125 s intenzitou $\geq$ pruhy IgM cut-off, měla by se pro jistotu provést celý status EBV séra (např. pomocí VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; obj. č. WE102G32/96 a VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot: WE102M32/96).

Pruhy **EBV-gp125** nejsou schváleny pro použití likvorové diagnostice.

Doporužené posuzování pruhu TpN17

Treponema pallidum Antigenové pruhy TpN17 (pouze u WE223G)

Pš sérové diagnostice lymské boreliózy jsou pozorovány křížové reakce s jinými mikroorganismy. Důležitou roli pštom zaujímají virové infekce Herpes (zejména EBV) jakož i bakteriální podmíněná onemocnění jako například syfilis. Lymská borelióza

MiQ12/2000 doporučil uje: Při mezních hodnotách nebo pozitivním orientačním testu poznámka: serologie lymfické boreliózy) má být proveden orientační test Lues (např. TPFA), aby se vyloučily chybné pozitivní nálezy na základě křížových reagujících protilátek proti *treponema* m.

Pruhy TpN17 slouží k rozpoznání chybných/pozitivních výsledků v sérové diagnostice lymfické boreliózy skrze křížových reagujících protilátky na základě infekce *treponema pallidum* (syfilis).

Reaguje-li při VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot pruh TpN17 ≥ pruh IgG cut-off a současně antigeny borelie v IgM a/nebo v IgG, měl by se pro jistotu provést kompletní status syfilis séra (např. pomocí VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot obj. : WE150G16/32 a VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot obj. : WE150M16/32).

Bezpodmínečně je třeba dbát na toto:

- Pruh TpN-17 nemůže ohledně senzitivity a specifity nahradit kompletní diferenciální diagnózu syfilis.
- Negativní antigenový pruh TpN17 v zásadě nevylučuje možnost existence protilátek proti *treponema pallidum*.
- Pozitivní výsledek antigenového pruhu TpN17 musí být zajištěn vhodným potvrzujícím testem *treponema pallidum* (např. VIROTECH WE150).
- Pruh TpN-17 není schválen pro použití v likvorové diagnostice.

Typické konstelace nálezů

Pořadí antigenů na testovacích proučcích testu Borrelia in vivo LINE bylo zvoleno tak, aby se antigeny (například: OspC, VlsE-IgM, VlsE-IgG), které preferovaně reagují s protilátkami pacientů s lymfickými boreliózami, nacházely v horní části proučků (blízko označovací části). Antigeny (například p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG), které preferovaně reagují s protilátkami pacientů s pokročilými stádii lymfické boreliózy, se nacházejí ve spodní části testovacího proučku (vzdáleně od označovací části). Tím poskytuje již optický dojem rozdělení pruhů na proučku upozornění na stadium infekce (od lymfické boreliózy k pozdní lymfické borelióze).

Příklady různých konstelací pruhů při různých stádiích infekce:

Stádium boreliózy	Sérologie třídy IgM	Sérologie třídy IgG
Lymfická borelióza	OspC	VlsE
	VlsE	VlsE
	p39	VlsE
	≥ 2 pruhy	žádný pruh nebo VlsE
	OspC	žádný pruh
Roztroušená lymfická borelióza	Může dojít k výskytu žádného až všech pruhů IgM.	VlsE a p39
		2 pruhy
Pokročilá lymfická borelióza	Pruhy IgM ustupují přebývajícím měrou do pozadí.	S pokračující infekcí se zpravidla vyskytuje stále více pruhů IgG v různých kombinacích. p39, p83, VlsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 a pG)

9.5 Omezení testu

- Negativní výsledek blotu zcela nevylučuje možnost infekce *B. burgdorferi* s.l. Vzorek mohl být odebrán před vznikem protilátek nebo titr protilátek leží pod prahovou hranicí tohoto testu.
- Léčení pacientů antibiotiky v lymfickém stádiu onemocnění (35, 37) může vést k potlačení imunitní odpovědi, takže nemohou být testem prokázány žádné protilátky specifické proti *B. burgdorferi*.

3. Křížová reakce mezi *Borrelia* a jinými spirochetami může vyvolávat vznik pruhů asociovaných s *Borrelia*, což může mít za následek nesprávně pozitivní výsledek. Séra pacientů například s následujícími infekcemi mohou reagovat křížovými reakcemi: syfilis (*Treponema pallidum*), frambézie (*Treponema pertenue*), rekurentní (návrtná) horečka (*Borrelia spezia*), leptospiróza (*Leptospira spezia*) (38). Právě tak může docházet ke křížovým reakcím u herpetických virů (HSV, CMV, parvovirus) (viz 34, 39). Projeví-li se u VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 LINE Immunoblot (WE223G) vedle reaktivit proti antigenům lymfické boreliózy také reaktivita proti antigenu TpN17, je třeba přihlídnout k upozorněním uvedeným v bodě 9.4 (Doporučené posuzování pruhů TpN17).
4. V rámci primární infekce viru EBV může z důvodu polyklonální stimulace buněk B docházet k reakcím protilátek proti antigenům *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Projeví-li se u VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot vedle reaktivit IgM a/nebo IgG proti antigenům borelie také reaktivita proti EBV-gp125, musí být pomocí diferenciální diagnostiky vyloučena mononukleóza.
5. V máločetných případech mohou séra pacientů vykazovat inverzní pruhy (tmavé pozadí, bílé pruhy); tyto nemohou být vyhodnocovány, to znamená, že test Immunoblot nelze v těchto případech vyhodnotit. Sérum by mělo být vyšetřeno jinými sérologickými metodami.

10. Literatura

1. Agüero-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. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. Infect. Immun. 60:4309-4321
14. 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
15. Moskopidhis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. lab. Med. 19:231-237
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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

20. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
21. 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
22. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
23. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
24. Wilske et al., 1988 Immunochemische Analyse der Immunantwort bei Spätmanifestationen der Lyme Borreliose. Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
25. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
26. Wilske & Preac-Mursic 1993 Microbiological diagnosis of Lyme Borreliose in: Aspects of Lyme borreliosis: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
27. 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
28. 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
29. Wilske et al., 1994 Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
30. Wilske, 1995 Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Internist 36:114-119
31. Wilske et al., 1997 *Borrelien*. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
33. Oschmann und Kraiczy, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag
34. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. 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
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. 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
39. 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
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, 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. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	15 µl séra/plazmy pacienta / 100 µl kontrola v 1,5 ml zředěného / promývacího pufru
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředěného / promývacího pufru
inkubace s konjugátem	30 minut	1,5 ml p zředěného konjugátu (1 + 100)
promývání	3 x 5 minut 1 x 1 minuta	1,5 ml zředěného / promývacího pufru destilovanou / deionizovanou vodou
inkubace se substrátem	10 ± 3 minut	1,5 ml roztoku substrátu
zastavení vývoje barvy	3 x bez meziinkubace	1,5 ml destilované / deionizované vody

Tabulka ředění konjugátu : (zaokrouhleno)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředěný / promývací pufr	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Koncentrovaný konjugát	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
konečný objem	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

počet proužků	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
zředěný / promývací pufr	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Koncentrovaný konjugát	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
konečný objem	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

počet proužků	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
zředěný / promývací pufr	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Koncentrovaný konjugát	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
konečný objem	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

počet proužků	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
zředěný / promývací pufr	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Koncentrovaný konjugát	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
konečný objem	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml