

VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot

(Borrelia EU IgG LINE-32; Borrelia EU IgG LINE-96)

Objednací číslo : WE224G32; WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

(Borrelia EU IgM LINE-32; Borrelia EU IgM LINE-96)

Objednací číslo : WE224M32; WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

(Borrelia EU + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-96)

Objednací číslo : WE225G32; WE225G96

POUZE K DIAGNOSTICE IN VITRO

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



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. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů	4
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)	5
7. Vyšetřovaný materiál	5
8. Provedení testu.....	5
8.1 Příprava vzorků.....	5
8.2 Příprava reagensů.....	5
8.3 Provedení testu Imunoblot	6
8.4 Použití analyzátorů Imunoblot	6
9. Vyhodnocení testu	6
9.1 Vyhodnocení vzorků pacientů	7
9.2 Použití hraniční kontroly Cut off.....	7
9.3 Význam antigenů	7
9.4 Kritéria vyhodnocení	9
9.5 Omezení testu	11
10. Literatura.....	11
11. Schéma provedení testu.....	15

1. Účel použití

Testovací souprava (kit) LINE Immunoblot slouží ke kvalitativnímu prokázání *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato specifických protilátek třídy IgG, popřípadě 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

Bílkoviny patogenu (antigeny) jsou speciální technikou přeneseny ve formě pásků na nitrocelulózovou membránu. Nitrocelulózová membrána je potom rozstříhávána na jednotlivé proužky.

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

3. Obsah balení

3.1 Souprava pro 32 analýz

1. IgG popř. IgM Nitrocelulózové testovací proužky s antigeny, zesílené fólií, seříděné v sešitku, připravené k použití	1x	32 proužků
2. Kontrola hraniční (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 Nitrocelulózové testovací proužky s antigeny, zesílené fólií, seříděné v sešitku, připravené k použití	3x	32 proužků
2. Kontrola hraniční (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:

Borrelia EU IgG LINE Ctrl-Set	WN224K60
Borrelia EU IgM LINE Ctrl-Set	WN224K80
Borrelia EU + TpN17 IgG LINE Ctrl-Set	WN225K60

IgG nebo IgM	ovládací prvky připravené k použití	Zkratka
1,0 ml IgG, nebo 1,0 ml IgM	neg. ctrl. / negativní kontrola, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připraveno k použití	NEG
1,0 ml IgG, nebo 1,0 ml IgM	Vypnutí klávesy Ctrl. / Cut off control, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připravené k použití	CO
1,0 ml IgG, nebo 1,0 ml IgM	poz. Ctrl. / pozitivní kontrola, lidské sérum/plazma se stabilizátory bílkovin a konzervační látkou, připravené k použití	POS

Pozitivní pásma > mezní pásmo lze převzít z dodaného certifikátu.

Negativní kontrola nevykazuje žádné pásy nebo žádné pásy relevantní pro hodnocení > cut off band..

4. Přechovávání a upotřebitelnost testovacích souprav a reagensů

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

1. Jednotlivé reagensie nenechte zmraznout 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 proužky** po vyjmutí ze sáčku ihned použijte. Sáček se zbylými proužky opět pevně uzavřete a přechováváte při teplotě 2 až 8°C. K archivaci výsledků by měly být nitrocelulózové testovací proužky bezpodmínečně chráněny před přímým slunečním světlem, aby se zabránilo jejich vyblednutí.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
testovací proužky	po otevření	+2 až +8°C (skladování v současně dodaném sáčku)	3 měsíce
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
konjugát	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	cca 6 hod
substrát	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +8°C	4 týdny
	po zředění (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 shledána negativní na protilátky proti HIV1/2 a HCV a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B.. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zředěné vzorky, konjugáty a nitro-celulózové testovací proužky 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 zodpovědnosti 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. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)

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

7. Vyšetřovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulancií), 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 zvláštní, individuálně vypočtené zředění likvoru/séra na třídu 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), čirý supernatant odpipetujte a použijte při testu.

8.2 Příprava reagensů

1. K adaptaci na laboratorní praxi lze použít všechna činidla LINE v jednom testovacím cyklu se stejnými časy inkubace a komponenty různých parametrů z různých šarží. Cut off kontroly se provádějí podle parametrů a šarže.
2. Před zředováním koncentrovaných reagensů 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. **Zředovací / 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 funkčnost ředícího/promývacího pufru ani na diagnostickou vypovídací schopnost prováděného testu.
5. **Konjugát IgG popř. IgM**
Konjugát 1 + 100 naředíte finálně zředěným zředovacím / promývacím pufr a dobře promíchejte. Na každý vzorek je zapotřebí 1,5 ml naředěného roztoku konjugátu. Viz tabulku ke zředování konjugátu (bod: „Schéma průběhu testu“).
6. **Roztok substrátu**
Roztok substrátu je dodáván přímo k použití..

8.3 Provedení testu Imunoblot

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

Pro správné provedení a posouzení Borrelia Europe LINE musí být při každém testu současně provedena Cut off kontrola odpovídající parametrům a šarži.

**Pro spolehlivou diagnostiku borrelií by měl být v testu Borrelia Europe LINE
proveden průkaz protilátek třídy IgG a IgM**

1. Test se provádí při teplotě místnosti.
2. Pro každý vzorek vložte po jednom proužku do žlábků čisté inkubační vaničky. Proužků se pokud možno dotýkejte pouze na označeném horním konci.
3. Napipetujte 1,5 ml **zředovací / promývací pufr** a vložte na třepačku.. Dbejte na to, aby nitrocelulózové testovací proužky byly kapalinou pokryty rovnoměrně. Proužky nesmějí 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 straně.
5. Na každých **15µl séra/plazmy pacienta** či **100µl pozitivní / negativní kontroly Cut off** pipetujte, pokud možno na horním, označeném konci proužku. Pacientovo sérum a kontrolu nechte **30 minut** inkubovat na třepačce.. Při pipetování a následujícím odsávání dbejte na to, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci ostatních vzorků.
6. Zcela odsajte kapalinu ze žlábků nebo opatrně odlijte. Při odlévání kapaliny zůstanou nitrocelulózové testovací proužky ulpělé na dně žlábků. Zbylou kapalinu odkapejte na filtrační papír.
7. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte. Před ukončením posledního promytí připravte potřebné množství čerstvého zředěného konjugátu (viz tabulka).
8. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
9. Napipetujte 1,5 ml **zředěného konjugátu** do žlábků s proužky a inkubujte **30 minut** na třepačce .
10. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků.
11. **Proužky se promyjí 3 x 5 minut** 1,5 ml z naředěného promývacího pufru na třepačce.. Promývací pufr vždy kompletně odsajte nebo odlijte . Dále promývejte **1 x 1 minutu destilovanou / deionizovanou vodou**.
12. Zcela odsajte nebo odlijte kapalinu ze žlábků (viz bod 6).
13. Napipetujte 1,5 ml **substrátu** do žlábků a nechte vyvíjet zbarvení na **třepačce 10 ± 3 minut**.
14. **Zastavte** vývoj barvy odliťm 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 čistém filtračním papíře. Zbarvení 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 přímo na NC Vám usnadní vyhodnocení vzorků pacientů.

Schéma provedení testu viz poslední stránku

8.4 Použití analyzátorů Imunoblot

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 prouzcích 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 pruhů zjistíte v protokolovacím listu.

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

pruhy IgG: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix nebo DbpA-Pko, p58, p83 a pruhy TpN17 k vylučovací diagnostice (pouze u WE 225G)

9.2 Použití hraniční kontroly Cut off

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

Pruhy IgM Cut off Bande: OspC

Pruhy IgG Cut off: VlsE-Mix

9.3 Význam antigenů

Přehled použitých vysoce purifikovaných a rekombinantních antigenů *Borrelia burgdorferi*, EBV-viral capsid antigenu gp125 a antigenu TpN 17. VlsE-Mix se skládá ze dvou rekombinantních antigenů genospecies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto a *Borrelia garinii*. DbpA-mix se skládá z rekombinantních genodruhů *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii* a z vysoce vyčištěných *Borrelia afzelii*.

Antigen/ Charakteristika	Význam antigenů	Specifičnost Specifičnost protilátek v LINII	Původní kmeny/čištění
OspC (p23) vysoce čištěný	Outer surface protein C. Plasmidem kódovaný lipoprotein (6, 22, 26, 28). Důležitý marker časných 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. zřejmě potřebuje OspC pro úspěšnou počáteční infekci savčího hostitele (48, 63, 70, 71). Spirochety exprimující OspC v krevní moučce v klíštěti a časně fázi infekce savčího hostitele (48). Po předání spirochet savci je exprese OspC opět down-regulována. Pro přetrvávající infekci se lipoprotein nezdá být nezbytný (48, 63). Tilly a kol. se domnívají, že OspC v časně fázi infekce savčího hostitele zabraňuje fagocytóze spirochet (64).	Specifický (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (původně 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 lipoprotein, který vykazuje konzervované, genospecie určující, vysoce imunogenní epitopy. V sérologii IgM budou pozorovány reaktivity proti VlsE, zejména u sér od pacientů s časným stádiem lymeské boreliózy. V sérologii IgG budou pozorovány reaktivity proti VlsE, u sér od pacientů s časným a pokročilým stádiem lymeské boreliózy. VlsE	Specifický	<i>B. burgdorferi</i> B31 (původně od infikovaného klíštěte izolovaného na ostrově Shelter Island, N. Y.), <i>B. garinii</i> IP90 (původně od infikovaného klíštěte izolovaného Rusku) /

	působí v sérologii IgG jako marker překrývajícího 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 savcích i přes aktivní imunitní odpověď. Předpokládá se, že kombinační variace antigenu povrchového proteinu VlsE - jako mechanismu „immune escape“ - přispívá k této perzistenci (42, 44, 56).		Purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
p39 (BmpA) rekombinantní	Borrelial membrane 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 (43, 57, 62).	Vysoce specifické (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKo (původně izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
DbpA vysoce purifikováno (DbpA PKo)/ rekombinantní (DbpA PBi, PBr, A14 S)	Decorin binding protein A (také Outer surface protein 17 nebo p17). Plazmid kódující lipoprotein. DbpAs z různých izolátů humánních patogenních druhů <i>B. burgdorferi</i>, <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. bavariensis</i> a <i>B. spielmanii</i> byly popsány jako senzitivní a specifické antigeny, které se vzájemně doplňují ve své reaktivitě (47, 60, 61, 69). Jsou markery sérologie IgM a IgG, zejména pro neuroboreliózy a lymeskou artritidu (50, 52, 57, 58, 59, 60). <u>Biologický význam:</u> Mikrobiální adheze k hostitelské tkáni představuje časný a kritický krok v patogenezí většiny infekčních onemocnění. Různé druhy borrelií exprimují dva decorin vázající adheziny exprimované na povrchu, DbpA A a B, které zprostředkovávají vazbu spirochet k extracelulární matrix hostitele. Borrelie dorazí ve slinách klíštěte do dermis, kde se vážou na kolagenová vlákna, nebo přes decorin vázající adheziny A a B na proteoglykan decorin asociovaný na povrchu kolagenu (46, 49, 72).	Vysoce specifické	<i>B. bavariensis</i> PBi a <i>B. garinii</i> PBr (původně izolovány z mozkomíšního moku pacientů s neuroboreliózou v Německu), <i>B. spielmanii</i> A14S (původně izolováno z lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie <i>B. afzelii</i> PKo (původně izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno preparativní SDS-Page
p58 (OppA-2) rekombinantní	Oligopeptide permease protein A-2 (OppA-2). Chromozomální kódovaný lipoprotein, který se udržuje mezi druhy (54). Důležitý marker v sérologii IgG pro pokročilé lymeské boreliózy (47, 51, 57, 67, 68). <u>Biologický význam:</u>	Vysoce specifické	<i>B. bavariensis</i> PBi (původně izolován z mozkomíšního moku pacientů s neuroboreliózou v Německu) Purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie

	OppA je membránový transportér, který hraje pravděpodobně nějakou roli v adaptaci <i>B. burgdorferi</i> s. l. na hostitelské prostředí (55, 66).		
p83/100 rekombinantní	Chromozomálně kódovaný, protoplazmatický cylindr asociovaný antigen (12, 13), který se udržuje uvnitř <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (17). Centrální marker v sérologii IgG pro pokročilé lymeské borreliózy (8, 24, 29).	Vysoce specifické (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	<i>B. afzelii</i> PKo (původně izolován z lidských lézí erythema migrans v Německu) / purifikováno z <i>E. coli</i> za použití Ni-NTA afinitní chromatografie
EBV VCA-gp125 afinitně purifikovaný	Dominantní imunitní vir Epstein-Barrův „Virus Capsid 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
<i>Treponema pallidum</i> TpN17 rekombinantní (pouze u WE225G)	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

9.4 Kritéria vyhodnocení

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

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

Doporučené hodnocení IgM¹

Vzniklé pruhy	Hodnocení
Výskyt následujících ≥ 2 pruhů: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix nebo izolovaného OspC (p23)	Pozitivní
Pouze jeden pruh: p39 BmpA, DbpA-Mix, VlsE-Mix	Hraniční
Žádný z následujících pruhů $\geq$ cut off pruhy: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	Negativní

¹ nach MIQ 12/2000 und DIN 58969-44 Juli 2005 [7,73]

Doporučené hodnocení IgG¹

Vzniklé pruhy	Hodnocení
Výskyt následujících ≥ 2 pruhů: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix a/nebo DbpA-PKo, VlsE-Mix	Pozitivní
Pouze jeden pruh: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix a/nebo DbpA-PKo, VlsE-Mix	Hraniční
Žádný z následujících pruhů $\geq$ cut off pruhy: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix a/nebo DbpA-PKo, VlsE-Mix	Negativní

*** Oba pruhy DbpA (Mix a PKo) budou v IgG vyhodnoceny jako 1 pruh**

Doporučené vyhodnocení při pozitivním VCA-gp125 v sérologii IgM

V rámci primární infekce EBV může na základě polyklonální stimulace B buněk dojít k aktivitám protilátek proti antigenům *Borrelia burgdorferi* sensu lato. To může mít za následek falešně pozitivní nález lymského borreliózy. K minimalizaci těchto nesprávných diagnóz obsahuje souprava VIROTECH *Borrelia Europe* IgM LINE Immunoblot antigen Epstein Barr virál vapsid antigen gp125. Jestliže vedle gp125 reagují zároveň antigeny *borrélií* (v IgM a/nebo IgG) s intenzitou $\geq$ než intenzita pruhů IgM cut-off, měl by se ověřit celkový stav EBV v séru (např. použitím testu VIROTECH EBV IgG LINE; obj.-č.: WE102G32/96 a VIROTECH EBV IgM LINE: WE102M32/96).

Doporučené vyhodnocení pruhů Tpn17

Pruhy antigenů Tpn17 *Treponema pallidum* (pouze u WE225G)

V sérologické diagnostice lymského borreliózy byla pozorována křížová reaktivita s ostatními mikroorganismy. Důležitou roli zde získávají infekce způsobené Herpes virem (zejména EBV) a také bakteriálně zapříčiněné onemocnění, například syfilis. Lyme-Borreliose MiQ12/2000 doporučuje: „V případě, že orientační test (poznámka: sérologie lymského borreliózy) má hraniční nebo pozitivní hodnoty, je třeba provést orientační test na lues (např. TPHA), aby se vyloučily falešně pozitivní nálezy vzniklé z důvodu křížové reaktivity protilátek proti spirochetám *Treponema*.“

Pruhy Tpn17 rozpoznávají falešně hraniční/pozitivní výsledky v sérologické diagnostice lymského borreliózy vzniklé z důvodu křížové reaktivity protilátek na základě infekce *Treponema pallidum* (syfilis).

Jestliže u testu VIROTECH *Borrelia Europe* + Tpn17 IgG LINE Immunoblot reagují pruhy Tpn17 s intenzitou $\geq$ než intenzita pruhů IgG cut-off a zároveň antigeny *borrélií* v IgM a/nebo v IgG, je nutné ověřit stav syfilis v séru (např. použitím testu VIROTECH *Treponema pallidum* IgG LINE Immunoblot a VIROTECH *Treponema pallidum* IgM LINE Immunoblot WE150).

Bezpodmínečně je potřeba mít na zřeteli:

- Pruhy Tpn-17 nemohou nahradit kompletní diferenční diagnózu syfilis ohledně senzitivity a specifčnosti.
- Negativní pruhy antigenu Tpn17 nevylučují zásadně možnost výskytu protilátek proti *Treponema pallidum*.
- Pozitivní výsledek pruhů antigenu Tpn17 se musí validovat vhodným potvrzovacím testem *Treponema pallidum* (např.: VIROTECH WE150).
- Pruhy Tpn-17 nebyly validovány pro použití v likvorové diagnostice.

9.5 Omezení testu

1. Negativní výsledek testu Blot přesto zcela nevylučuje možnost borréliové infekce. Vzorek mohl být odebrán před vznikem protilátek nebo titr protilátek leží pod průkazní hranicí tohoto testu.
2. Léčení pacientů antibiotiky v časném 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 *borréliemi* a jinými spirochetami může vyvolávat vznik pruhů asociovaných s borréliemi, 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* sp. spec.), leptospirózy (*Leptospira* sp. spec.) (38). Může také docházet ke křížovým reakcím mezi Herpes virem (HSV, CMV) a parvovirem (34, 39). Jestliže se u testu VIROTECH *Borrelia* Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE225G) objevují vedle reaktivit proti antigenům lymského boreliózy také reaktivity proti antigenům TpN17, je potřeba vzít do úvahy pokyny uvedené v části 9.4 (Doporučené vyhodnocení pruhů TpN17).
4. V rámci primární infekce virem EBV může z důvodu polyklonální stimulace buněk B docházet k reakcím protilátek proti antigenům *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Jestliže se u testu VIROTECH *Borrelia* Europe IgM LINE Immunoblot objevují vedle reaktivit proti antigenům borrelií (IgM a/nebo IgG) také reaktivity proti EBV-gp125, musí se diferenční diagnostikou vyloučit mononukleóza.
5. V málo četných 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. Bakteri. 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 Kraicz, (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 Borrelieninfektion, 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. 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
43. Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Carbonaro, C.A., Wormser, G.P., Aguero-Rosenfeld, M.E., Cabello, F.C. (2005) *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 12: 935-940
44. 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

45. 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
46. Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., Leong, J.M. (2003) Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 7307-7312
47. Göttner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 43: 3602-3609
48. 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
49. Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Hook, M. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 30: 711-723
50. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1998) Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Clin Diagn Lab Immunol 5: 456-462
51. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1999) Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 37: 2241-2247
52. Heikkilä, T., Seppälä, I., Saxen, H., Panelius, J., Yrjänäinen, H., Lahdenne, P. (2002) Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. J Clin Microbiol 40: 453-460
53. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraicz, 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
54. Kornacki, J.A., Oliver, D.B. (1998) Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. Infect Immun 66: 4115-4122
55. Medrano, M.S., Ding, Y., Wang, X.G., Lu, P., Coburn, J., Hu, L.T. (2007) Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 189: 2653-2659
56. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
57. Nowalk, A.J., Gilmore, R.D., Jr., Carroll, J.A. (2006) Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. Infect Immun 74: 3864-3873
58. Panelius, J., Lahdenne, P., Saxen, H., Carlsson, S.A., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Lauhio, A., Seppälä, I. (2003) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR6 peptide. J Neurol 250: 1318-1327
59. Panelius, J., Sillanpää, H., Seppälä, I., Sarvas, H., Lahdenne, P. (2007) Antibodies to recombinant decorin-binding proteins A and B in the cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis. Scand J Infect Dis 39: 775-780
60. Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J., Wilske, B. (2003) Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. J Clin Microbiol 41: 1299-1303
61. Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., Goettner, G., Rogge, S., Wilske, B. (2006) Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the dbpA gene. Int J Med Microbiol 296 Suppl 40: 250-266
62. Shin, J.J., Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Cabello, F.C. (2004) Localization of BmpA on the exposed outer membrane of *Borrelia burgdorferi* by monospecific anti-recombinant BmpA rabbit antibodies. Infect Immun 72: 2280-2287
63. 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
64. 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

65. 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
66. Wang, X.G., Kidder, J.M., Scagliotti, J.P., Klemperer, M.S., Noring, R., Hu, L.T. (2004) Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (Opp) operon. J Bacteriol 186: 51-60
67. Wilske, B., Hauser, U., Lehnert, G., Jauris-Heipke, S. (1998) Genospecies and their influence on immunoblot results. Wien Klin Wochenschr 110: 882-885
68. Wilske, B., Habermann, C., Fingerle, V., Hillenbrand, B., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Pradel, I., Rossler, D., Schulte-Spechtel, U. (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol (Berl) 188: 139-144
69. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 49: 13-21
70. 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
71. 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
72. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2007b) Increasing the interaction of *Borrelia burgdorferi* with decorin significantly reduces the 50 percent infectious dose and severely impairs dissemination. Infect Immun 75: 4272-4281
73. 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.

11. Schéma provedení testu

Provedení testu

inkubace vzorků	30 minut	15 µl séra/plazmy pacienta/100 µl kontrola v 1,5 ml zředovacího / promývacího pufru
promývání	3 x 5 minut	1,5 ml zředovacího / 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 zředovacího / 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 : (zaokrouhleně)

počet proužků	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
zředovací / 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
zředovací / 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
zředovací / 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
zředovací / 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