

VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot

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

Numer zamówienia: WE224G32; WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

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

Numer zamówienia: WE224M32; WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

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

Numer zamówienia: WE225G32; WE225G96

TYLKO DO DIAGNOSTYKI 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**



Spis treści

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada przeprowadzania badań	3
3. Zawartość opakowania	3
3.1 Zestaw dla 32 określeń	3
3.2 Zestaw dla 96 określeń	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)	5
7. Materiał badawczy	5
8. Przeprowadzanie testu /badania/	5
8.1 Przygotowanie próbek	5
8.2 Przygotowywanie odczynników	5
8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot	6
8.4 Zastosowanie procesorów Immunoblot	7
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	10
9.5 Granice testu	11
10. Literatura	12
11. Symbole	15
12. Schemat przebiegu testu	16

1. Cel zastosowania

Zestaw testowy linii Immunoblot do jakościowego wykazywania swoistych przeciwciał IgG lub IgM *Borrelia (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 płynu mózgowo-rdzeniowego na neuroboreliozę. W celu zastosowania w diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego należy zamówić osobną instrukcję roboczą

2. Zasada przeprowadzania badań

Białka antygeny czynnika chorobotwórczego są przenoszone za pomocą specjalnej metody rozpyłowej na membranę nitrocelulozową. Membrana nitrocelulozowa zostaje następnie pocięta na pojedyncze paski.

Inkubacja opłaszczonych antygenami pasków z nitrocelulozy 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 nie barwionego podłoża-substratu, który w wyniku enzymatycznej przemiany wytwarza niebiesko-fioletowe pasma /"pasma antygeny"/. 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 zeszytik, 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 rozcieńczania/płukania, pH 7,3 (10x stęż.), ze środkiem konserwującym i Tris	2x	50 ml
4. Koniugat IgG lub IgM (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 protokolowania i archiwizowania wyników	1x	1 sztuka.

3.2 Zestaw dla 96 określeń

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

Na życzenie dostępne również:

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

IgG resp. IgM	gotowy do użycia kontrole	Skrót
1,0 ml IgG, resp. 1,0 ml IgM	neg. Ctrl. / kontrola negatywna, surowica/osocze ludzkie ze stabilizatorami białkowymi i konserwantem, gotowa do użycia	NEG
1,0 ml IgG, resp. 1,0 ml IgM	Cut off Ctrl. / Cut off kontrola, surowica/osocze ludzkie ze stabilizatorami białkowymi i środkiem konserwującym, gotowa do użycia	CO
1,0 ml IgG, resp. 1,0 ml IgM	pos. Ctrl. / kontrola pozytywna, surowica/osocze ludzkie ze stabilizatorami białkowymi i środkiem konserwującym, gotowa do użycia	POS

Pozytywne pasma > Cut off band można znaleźć na dostarczonym certyfikacie.

Kontrola negatywna nie wykazuje żadnych pasm lub nie wykazuje pasm istotnych dla oceny > Cut off band.

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 wyjęciu pasków z torebki należy ich natychmiast użyć. Torebki z nieużywanymi 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 (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc 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. Obowiązują 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 użytku. 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 wodociągową 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

13. 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).
14. Próbkę krwi należy pobierać w warunkach aseptycznych poprzez punkcję żyły. Po całkowitej koagulacji należy oddzielić surowicę (nie dotyczy osocza). Chcąc przechowywać próbki dłużej surowicę należy zamrażać w temperaturze -20°C.
15. Unikać należy powtórnego zamrażania i rozmrażania surowic.
16. Surowice, które zostały deaktywizowane w temperaturze dodatniej, lipemicznie, hemolitycznie lub kontaminowane mikrobiologicznie prowadzić mogą do sfałszowanych wyników, dlatego też nie powinny być używane i wykorzystywane.
17. Nie używać i nie wykorzystywać zmętniałych próbek surowicy /w szczególności po ich rozmrożeniu/, w razie konieczności centryfugować /5 minut w sytuacji 1000 x g/, wyklarować /oczyścić/, odpipetować warstwę górną, po czym wykorzystać w teście badawczym.

8.2 Przygotowywanie odczynników

18. W celu dostosowania do procedur laboratoryjnych możliwe jest przetwarzanie wszystkich testów LINE w jednym przebiegu testu z takimi samymi czasami inkubacji i składnikami niezależnymi od parametrów/serii. Kontrole cut off są stosowane w sposób swoisty dla parametrów i serii.
19. 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.
20. Roztwory rozcieńczone należy przed zastosowaniem ich do testów dobrze przemieszać.
21. **Środek myjny buforowy rozcieńczający**
Bufor do rozcieńczania/płukania jest dostępny w 10-krotnym stężeniu. Koncentrat buforu do rozcieńczania/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 rozcieńczania/płukania może mieć ewentualnie żółte zabarwienie. Takie

żółte zabarwienie nie ma wpływu na okres trwałości buforu do rozcieńczania/płukania, ani na funkcjonalność i znaczenie diagnostyczne testu.

22. **Koniugat IgG lub IgM**

Koniugat rozcieńczyć 1 + 100 ostatecznie rozcieńczonym buforem do rozcieńczania/płukania. Dobrze wymieszać. Na jedną próbkę surowicy wymagane jest 1,5 ml roztworu użytkowego koniugatu. Patrz tabela rozcieńczania koniugatu (punkt: "Schemat przebiegu badania").

23. **Roztwór substratu**

Roztwór substratu dostarczany jest w stanie gotowym do użytku.

8.3 Przeprowadzanie testu Immunoblot

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

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

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

24. Test przeprowadzać należy w temperaturze pokojowej.
25. W odniesieniu do każdej próbki włożyć każdorazowo 1 pasek do rynny czystej wanny inkubacyjnej. Paski dotykać należy możliwie jedynie na oznakowanym górnym ich końcu.
26. Pipetować każdorazowo 1,5ml gotowego do użytku **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.
27. Przykryte płynem /dosł. schowane/ paski testowe nitrocelulozowe całe są nawilżane w czasie jednej minuty, i inkubowane być mogą zarówno w położeniu grzbietowym, brzuszny lub boczny.
28. 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 łącznego odlewania zwracać uwagę na to, by nie doszło do kontaminacji krzyżowej/skrzyżowanej poszczególnych próbek pacjentów.
29. 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 odkropić na papier chłonny /bibułę/.
30. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użytku środka 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/.
31. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać /zobacz - punkt 6/.
32. Pipetować każdorazowo 1,5 ml sporządzonego **roztworu koniugatu** do odpowiednich rynien inkubacyjnych, po czym inkubować go na wstrząsaczu **30 minut**.
33. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać.
34. **Mycie** pasków: inkubować paski każdorazowo na wstrząsaczu używając 1,5 ml gotowego do użytku środka myjnego buforowego rozcieńczającego w czasie 3 x 5 minut. Za każdym razem bufor myjny całkowicie odessać lub odlać. Następnie splukać **wodą destylowaną lub wodą dejonizowaną w czasie 1 x 1 minuta**.
35. Wyssać płyn całkowicie z rynien lub odlać (zobacz - punkt 6).
36. Pipetować każdorazowo 1,5 ml gotowego do użytku **roztworu substratu** do rynien, po czym rozwijać go w czasie **10 ± 3 minuty** na wstrząsaczu.
37. **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**.
38. Odląć wodę destylowaną /wodę dejonizowaną/, po czym suszyć paski na czystym zdolnym 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.

39. Celem sporządzenia oceny wykorzystać dołączony protokół oceny. Opisy i napisy szczegółowe na karcie protokołowej ułatwią 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 nadają się wszystkie dostępne w handlu automaty Blot.

9. Ocena wyników badania

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

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

Przeprowadzenie testu jest udane /dosł. aktualne/, gdy na rozwiniętym pasku testowym nitrocelulozowym można rozpoznać w sposób wyraźny zarówno kontrolę surowicy, jak również i wewnętrzną kontrolę koniugatu. Pozycję paska kontrolnego surowicy oraz paska kontrolnego koniugatu znajdziecie Państwo w karcie protokołu.

9.1 Ocena próbek pacjentów

Pozycję oraz określenie pasm kontrolnych znajdziecie Państwo w karcie protokołu.

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

Pasmo IgG: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix lub DbpA-Pko, p58, p83 i pasmo TpN17 do diagnostyki wykluczającej (tylko przy WE 225G)

9.2 Zastosowanie kontroli typu Cut off

Pasm, których intensywność jest słabsza od pasm Cut off kontroli typu Cut off nie należy wciągać do procesu oceny.

Pasmo IgM Cut off : OspC

Pasmo IgG Cut off: VlsE-Mix

9.3 Znaczenie antygenów

Wykaz wykorzystanych wysoko oczyszczonych i rekombinowanych antygenów *Borrelia burgdorferi*, antygen EBV-Viral Capsid Antigen gp125 i antygen TpN 17. VlsE-Mix składa się z dwóch rekombinowanych antygenów genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu stricto i *Borrelia garinii*. DbpA-Mix składa się z rekombinowanych genogatunków *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii* i wysoko oczyszczonych *Borrelia afzelii*.

Antygen/ nazwa	Znaczenie antygenów	Swoistość przeciwciał w LINE	Szczepy pierwotne/oczyszczanie
OspC (p23) wysoko oczyszczone	Outer surface-protein C. Lipoproteina kodowana przez plazmidy (6, 22, 26, 28). Ważny 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 początkowego zakażenia ssaka-gospodarza (48, 63, 70, 71). Do ekspresji OspC przez krętki dochodzi podczas wysysania krwi przez kleszcza i wczesnej fazy zakażenia ssaka-gospodarza (48). Po przeniesieniu krętków na ssaka dochodzi do ponownego zmniejszenia ekspresji OspC. Wydaje się, że lipoproteina nie jest konieczna do trwałego zakażenia (48, 63). Tilly i wsp. przypuszczają, że	Swoistość (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	<i>B. afzelii</i> PKO (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej ludzkim rumieniem wędrującym (Erythema migrans) w Niemczech/oczyszczone poprzez preparacyjne SDS-Page

	OspC podczas wczesnej fazy zakażenia ssaka-gospodarza uniemożliwiają fagocytozę krętków (64).		
VlsE rekombinowane	Variable major protein like sequence E. Lipoproteina z ekspresją <i>in vivo</i>, wykazująca zachowane epitopy o dużej immunogenności, wykraczające poza genogatunki. W badaniach serologicznych IgM reaktywność na VlsE obserwowana jest zwłaszcza w surowicach pacjentów ze wczesnymi boreliozami z Lyme. W badaniach serologicznych IgG reaktywność na VlsE obserwowana jest w surowicach pacjentów ze wczesnymi i zaawansowanymi boreliozami z Lyme. VlsE jest w badaniach serologicznych IgG markerem boreliozy z Lyme w różnych stadiach choroby. VlsE jest antygenem o 35 kDa, kodowanym na lp28-1 (2). <u>Znaczenie biologiczne:</u> <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 przetrwałości jako mechanizm „immune escape” (42, 44, 56).	swoistość	<i>B. burgdorferi</i> B31 (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza na Shelter Island, N. Y.), <i>B. garinii</i> IP90 (pierwotnie wyizolowane z zakażonego kleszcza w Rosji) / 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 (43, 57, 62).	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
DbpA wysoko oczyszczone (DbpA Pko)/ rekombinowane (DbpA PBi, PBr, A14 S)	Decorin binding protein A (również Outer surface protein 17 lub p17). Lipoproteina kodowana przez plazmidy. Białka DbpA z różnych izolatów patogennych dla ludzi gatunków <i>B. burgdorferi</i>, <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. bavariensis</i> i <i>B. spielmanii</i> opisano jako antygeny wrażliwe i swoiste, które uzupełniają się wzajemnie w swojej reaktywności (47, 60, 61, 69). Są to markery serologii IgM i IgG, przede wszystkim dla neuroboreliozy i boreliozowego zapalenia stawów (50, 52, 57, 58, 59, 60). <u>Znaczenie biologiczne:</u> Adhezja drobnoustrojów do tkanek gospodarza stanowi wczesny, krytyczny krok w patogenie większości chorób zakaźnych. Różne gatunki <i>Borrelia</i> powodują ekspresję dwóch, ulegających ekspresji na powierzchni adhezyn wiążących dekorynę, DbpA i B, które pośredniczą w wiązaniu krętków do macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza.	duża swoistość	<i>B. bavariensis</i> PBi i <i>B. garinii</i> PBr (pierwotnie wyizolowane z płynu mózgowo-rdzeniowego pacjenta z neuroboreliozą w Niemczech), <i>B. spielmanii</i> A14S (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej rumieniem wędrującym (Erythema migrans) w Holandii / oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA

	Krętki <i>Borrelia</i> przedostają się w ślinie kleszcza do skóry właściwej i wiążą się tam z włóknami kolagenowymi lub poprzez adhezyny wiążące dekorynę A i B ze związanym z kolagenem proteoglikanem - dekoryną (46, 49, 72).		<i>B. afzelii</i> PKO (pierwotnie wyizolowane ze zmiany spowodowanej ludzkim rumieniem wędrującym (<i>Erythema migrans</i>) w Niemczech/oczyszczone poprzez preparacyjne SDS-Page
p58 (OppA-2) rekombinowane	Oligopeptide permease protein A-2 (OppA-2). Lipoproteina kodowana chromosomalnie, która jest zachowywana między gatunkami (54). Ważny marker boreliozy z Lyme w zaawansowanym stadium w badaniach serologicznych IgG (47, 51, 57, 67, 68). <u>Znaczenie biologiczne:</u> OppA jest transporterem membranowym, który może odgrywać rolę w adaptacji <i>B. burgdorferi</i> s. l. do otoczenia gospodarza (55, 66).	duża swoistość	<i>B. bavariensis</i> PBI (pierwotnie wyizolowane z płynu mózgowo-rdzeniowego pacjenta z neuroboreliozą 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> sensu lato (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 (<i>Erythema migrans</i>) w Niemczech/oczyszczone z <i>E. coli</i> poprzez zastosowanie chromatografii powinowactwa Ni-NTA
EBV VCA-gp125⁺ oczyszczone za pomocą chromatografii powinowactwa	Immunodominujący antygen kapsydu wirusa Epsteina Barra „Epstein Barr Virus Capsid Antigen”. Przeciwciała 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 kiły 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

9.4 Kryteria oceny

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

Oceniane będą pozytywnie jedynie te pasma, które wykazują intensywność $\geq$ pasm typu cut off.

Zalecana ocena IgM¹

Występujące pasmo (-a)	Ocena
Występowanie ≥ 2 pasm: p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix lub wyizolowane OspC (p23)	Pozytywna
Tylko jedno pasmo: p39 (BmpA), DbpA-Mix, VlsE-Mix	Wartości graniczne
Żadne z następujących pasm $\geq$ pasm cut off: p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	Negatywna

Zalecana ocena IgG¹

Występujące pasmo (-a)	Ocena
Występowanie ≥ 2 pasm: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix i/lub DbpA-PKo, VlsE-Mix	Pozytywna
Tylko jedno pasmo: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix i/lub DbpA-PKo, VlsE-Mix	Wartości graniczne
Żadne z następujących pasm $\geq$ pasm cut off: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix i/lub DbpA-PKo, VlsE-Mix	Negatywna

* Oba pasma DbpA (Mix i PKo) są oceniane w IgG wspólnie jako 1 pasmo.

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

W ramach pierwotnej infekcji EBV dojść może w oparciu o poliklonalną stymulację komórek B do aktywności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Wyniknąć stąd może błędnie pozytywna ocena boreliozy z Lyme. Celem zminimalizowania tego typu diagnoz fałszywych VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot zawiera antygen Epstein Barr Viral Capsid gp125. Jeśli oprócz gp125 reagują również antygeny Borrelia (w IgM i/lub IgG) z intensywnością $\geq$ pasm cut

off IgM, należy dla pewności sprawdzić również całkowity status EBV w surowicy (np. za pomocą testu VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot, nr zam. WE102G32/96 i VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot nr zam.: WE102M32/96).

Zalecana ocena pasma TpN17

Pasmo antygenów *Treponema pallidum* TpN17 (tylko WE225G)

Podczas diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme obserwowane są reakcje krzyżowe z innymi mikroorganizmami. Ważną rolę odgrywają tu zakażenia wirusem opryszczki (zwłaszcza EBV) oraz bakteryjnie uwarunkowane choroby, takie jak kiła. Zalecenia dotyczące prawidłowej diagnostyki boreliozy z Lyme „Lyme-Borreliose MiQ12/2000” są następujące: „W przypadku uzyskania granicznego lub pozytywnego wyniku testu przesiewowego (przyp.: diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme) należy wykonać test przesiewowy w kierunku kiły, aby wykluczyć fałszywie pozytywne wyniki wywołane reagującymi krzyżowo przeciwciałami skierowanymi przeciwko krętkom.”

Pasmo TpN17 służy do rozpoznania fałszywie granicznych/pozytywnych wyników w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme wywołanych reagującymi krzyżowo przeciwciałami z powodu zakażenia *Treponema pallidum* (kiły).

Jeśli w teście VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot pasmo TpN17 reaguje $\geq$ pasma cut off IgG i równocześnie antygeny borelii w IgM i/lub IgG, należy dla pewności sprawdzić całkowity status kiły w surowicy (np. za pomocą testu VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot i VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot WE150).

Należy bezwzględnie przestrzegać:

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

9.5 Granice testu

1. Negatywny wynik testu Blot nie wyklucza całkowicie możliwości występowania zakażenia Borrelia- Próbką mogła zostać pobrana przed wystąpieniem przeciwciał lub też miano przeciwciał leży poniżej granicy stwierdzania-wykazywania testu.
2. Leczenie pacjentów antybiotykami we wczesnym stadium schorzenia /35, 37/ prowadzić może do stłumienia/zatajenia odpowiedzi immunologicznej do tego stopnia, iż nie będą mogły zostać wykazane/stwierdzone przeciwciała swoiste dla *anti-B.burgdorferi*.
3. Reakcja krzyżowa pomiędzy *Borrelia* oraz innymi krętkami, prowadzić może do wystąpienia zasocjowanych z Borrelią pasm, co może ostatecznie doprowadzić do fałszywego pozytywnego wyniku. Surowice pacjentów z na przykład następującymi - niżej podanymi - infekcjami mogą reagować w sposób krzyżowy: syfilis (*Treponema pallidum*), malinica, frambezia, jagodzica (*Treponema pertenue*), gorączka powrotna (*Borrelia spec.*), leptospiroza (*Leptospiren spec.*) (38). Również w przypadku wirusów opryszczki (HSV, CMV) i Parvovirus dojść może do reakcji krzyżowych (34, 39). Jeśli w teście VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE225G) 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 komórkową B dojść może do aktywności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* sensu lato (34, 39). Jeśli w teście VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot wykazywana jest oprócz reaktywności na antygeny Borrelia (IgM i/lub IgG) również reaktywność na EBV-gp125, konieczne jest wykluczenie mononukleozy poprzez przeprowadzenie diagnostyki różnicowej.
5. W rzadkich przypadkach surowice pacjentów wykazywać mogą „różne” pasma /ciemne podłoże-tło, 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. Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the seradiagnosis 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 antibody 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. Moskopidis 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. Bakteriell. 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 Borrelien infektion, 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., Seppala, 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., Seppala, 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., Klempner, 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. 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 każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego
Inkubacja koniugatu	30 minut	Z obecnością 1,5 ml roztworu użytkowego (1 + 100)
Mycie	3 x 5 minut	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml środka myjnego buforowego rozcieńczającego
	1 x 1 minuta	Z obecnością wody destylowanej lub dejonizowanej
Inkubacja substratu	10 ± 3 minut	Z obecnością każdorazowo 1,5 ml roztworu substratu
Zatrzymywanie	3 x bez fazy pośredniej inkubowania	Z obecnością każdorazowo Mit je 1,5 ml wody destylowanej lub wody dejonizowanej

Tabela rozcieńczania koniugatu: /wartości zaokrąglone/ Ko:

Liczba pasków	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	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
Środek myjny buforowy rozcieńczający	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
Pojemność końcowa	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml