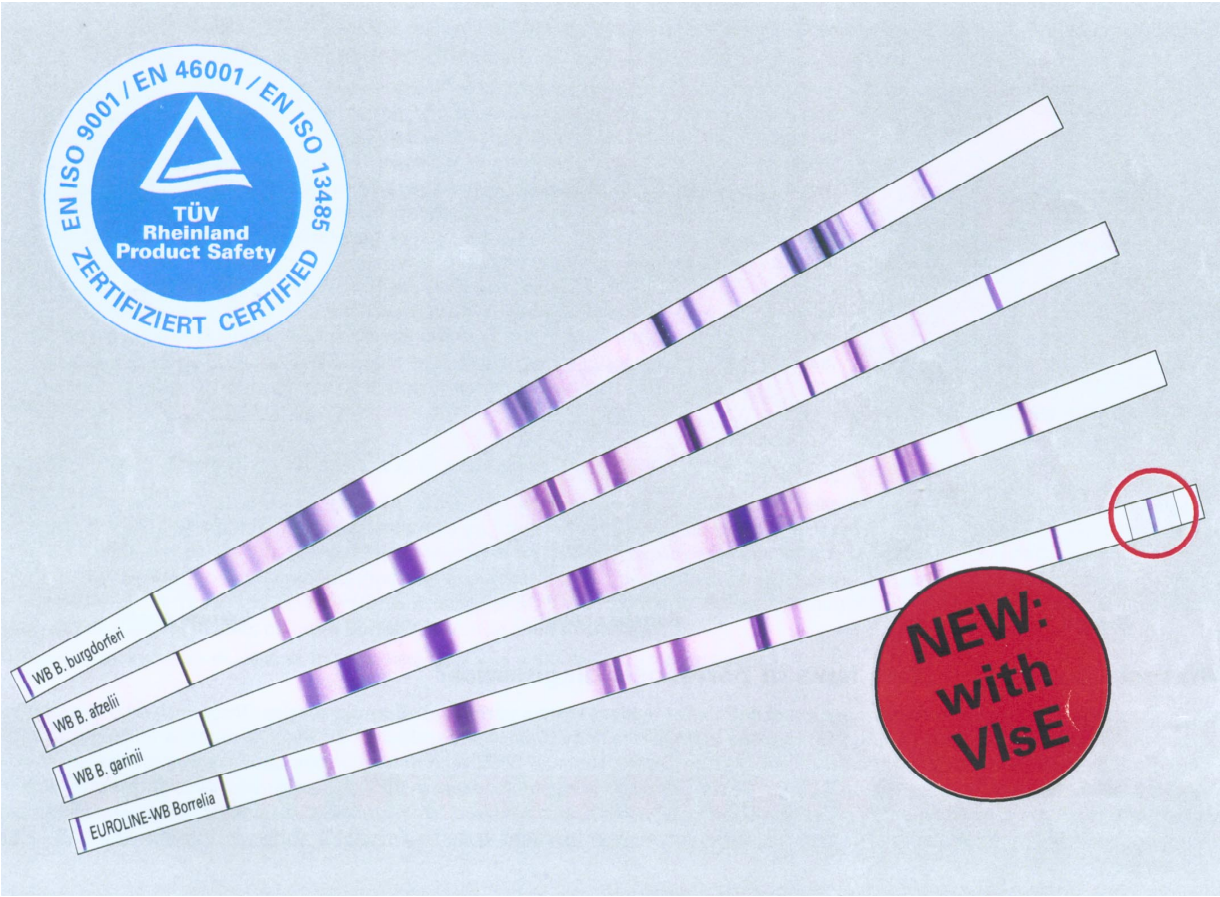
EUROIMMUN Laboratorium für experimentelle Immunologie GmbH

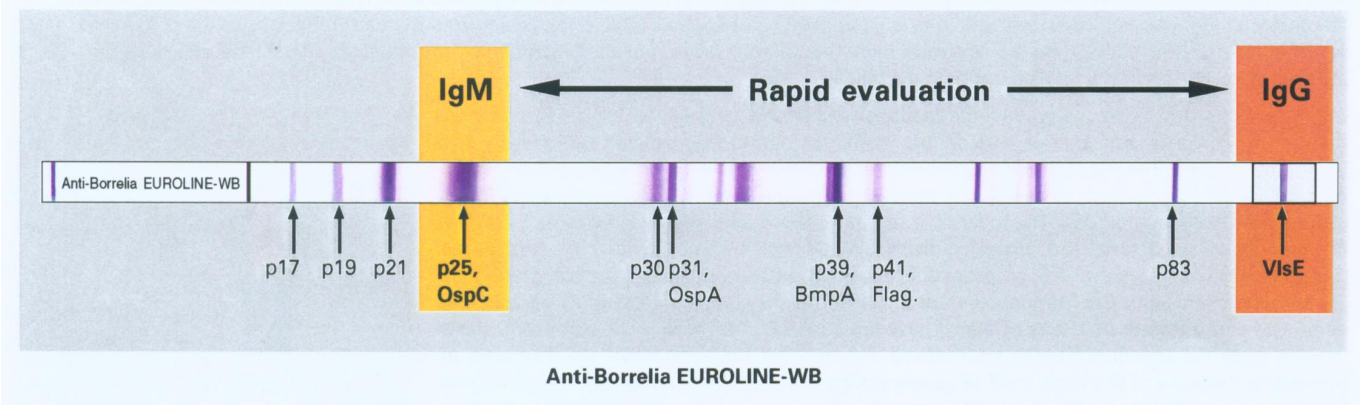
EUROIMMUN - systémy pro diagnózu borreliózy Westernblotem



- V souladu s doporučením Německé společnosti pro hygienu a mikrobiologii
- Celkový extrakt antigenů borrelie- jeho užití je o více než 23 % citlivější než užití směsi rekombinantních antigenů
- Kromě toho nově identifikovaný hlavní antigen borrelie VlsE, jehož užití zvyšuje citlivost testu o dalších 20 %
- Okamžité vyhodnocení: anti- borrelia IgG a IgM
- EUROIMMUN: Odborník na sérologii borreliózy!
- Vysoce diferencované spektrum výrobků zahrnující ELISA, IIFT, Westernblot a EUROLINE-WB, k dispozici substráty Certifikované podle EN ISO 9001/ EN 46001/ EN ISO 13485 antigenů pro všechny druhy borrelie

EUROIMMUN Laboratorium für experimentelle Immunologie GmbH

Anti-Borrelia EUROLINE –WB - optimální diagnostika s celkovým extraktem antigenů Borrelie plus VlsE



EUROLINE-WB- významný pokrok v diagnostice protilátek

V systému blotů „**line blot" EUROLINE** se vyčištěné, biochemicky charakterizované antigeny nanesou v paralelních liniích na definovaná místa membrány. Reakce lze snadno vyhodnotit, ale spektrum užitých antigenů je často omezeno. Klasické westernblotové systémy používající nativní antigeny poskytují kompletní spektrum antigenů kultivovaných buněk, tkání, či infekčních agens, kdy jednotlivé proteiny jsou elektroforeticky rozděleny podle velikosti. Avšak velké množství antigenů na proužcích membrány znesnadňuje vyhodnocení membrány, protože jednotlivé antigeny leží často velmi blízko sebe. EUROLINE-WB kombinuje výhody obou metod: k okamžitému použití připravené westernblotové proužky jsou vybaveny EUROLINE membránovými čipy, které jsou připraveny na základě buď nativních, afinitní chromatografií čištěných antigenů, nebo rekombinantních antigenů. Pro každý antigen byla vybrána nejvhodnější membrána a také nejvhodnější „koutovací" postup.

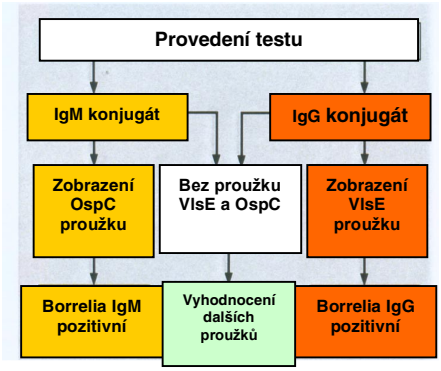
Proč je VlsE ještě navíc využíván jako rekombinantní antigen?

Ze studie provedené v ústavu Max von Pettenkofera (German Borrelia Reference Centre – Německá referenční laboratoř pro výzkum Borrelia) vyplývá, že dodatečným určením protilátek proti VlsE **se zvýší účinnost testu o 20 % ve srovnání s použitím westernblotového testu pracujícího s celkovým extraktem antigenů a o 30 % ve srovnání s westernblotovým testem využívajícím rekombinantní antigeny**. Ze všech testovaných rekombinantních antigenů, VlsE poskytuje nejvyšší citlivost při detekci borreliové infekce (Schulte-Spechtel et al., J.Clin.Microbiol. 41: 1299-1303, 2003). Tyto výsledky byly potvrzeny i interní studií (Meyer et al., vědecká prezentace výsledků na 32. Kongresu Německé revmatologické společnosti, Frankfurt, 2003). Přes 85 % IgG pozitivních sér bylo okamžitě identifikováno pomocí určení reakce s proužkem VlsE. VlsE umožňuje detekce všech druhů Borrelií a riziko falešné negativní reakce způsobené rozdíly v druhu Borrelií je desetkrát menší.

Použitý antigen	Pozitivní reakce u pacientů s neuroboreliózou
Rekombinantní VlsE	83, 3%
Extrakt celkových antigenů	63,8%
Směs rekombinantních antigenů: P83/100, p39, p41, OspC, Osp17, p58	52,7 %

Kvalitativní znaky EUROIMMUN anti-Borrelia EUROLINE-WB (celkové antigeny + VlsE)

Jednoduché vyhodnocení bez nerozhodných výsledků	+
Extrakt celkových antigenů Borrelia: vysoká citlivost, včetně čerstvých infekcí	+
VlsE antigen: vysoká citlivost pro všechny druhy Borrelia	+
Vysoce specifická reakce IgM s OspC, zdraví dárci krve negativní	+
Okamžitá identifikace 85 % IgG pozitivních sér (VlsE)	+
Identifikace atypických pozitivních reakcí (kompletní spektrum antigenů)	+
Kvalita v souladu s DGHM doporučeními	+



Vyhodnocení anti-Borrelia EUROLINE -WB

Následující EUROIMMUN testovací systémy obsahují hlavní antigen Borrelie VlsE: **Anti-VlsE ELISA (objednací číslo: EI 2132-9601-1G nebo M)** a **Anti-Borrelie EUROLINE-WB (objednací číslo: DY 2131-1601-1G nebo M).** Vyhodnocovací systém **EUROLineScan,** vyvinutý EUROIMMUN, poskytuje plně automatické vyhodnocení westernblotových proužků a dokumentaci výsledků.

DYNEX

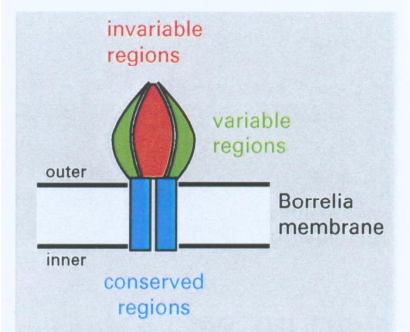
Na Čihadle 32, 160 00 Praha 6, tel.: 224 313 375

Nově identifikovaný VlsE- hlavní antigen pro sérologii borrelie

Co je to VlsE a jaká je jeho funkce?

VlsE (**v**ariable major protein-**l**ike **s**equence, **e**xpressed = exprimovaná sekvence podobná sekvenci hlavního variabilního proteinu) je nově charakterizovaný **povrchový protein Borrelia burgdorferi.** Jeho význam pro sérologickou diagnostiku borreliozy byl až do nedávné doby přehlížen. VlsE hraje klíčovou roli ve strategii přežití borrelie. Po vniknutí do hostitelského organismu borrelie neustále mění svoje povrchově exprimované VlsE a touto cestou se snaží uniknout rozpoznání a eliminaci imunitním systémem.

VlsE protein se dělí na několik částí: chráněné (conserved) části, které slouží jako transmembránové domény a kotva pro VlsE v bakteriální membráně, a dále na variabilní a konstantní oblasti. Variabilní části VlsE jsou nasměrovány ven a jsou neustále měněny rekombinací (viz níže), čímž se zasahující imunitní systém setkává neustále s novými, pozměněnými antigenními epitopy. Konstantní oblasti jsou maskovány variabilními oblastmi a v žijících borreliích jsou tak chráněny od přímého zásahu imunitního systému. Jakmile je mrtvá bakterie borrelie zpracována antigen-prezentujícími buňkami, je také kompletní VlsE protein prezentován imunitnímu systému a hostitelský organismus tvoří **protilátky proti konstantním a konzervovaným oblastem VlsE.** Tyto protilátky nemohou reagovat s borreliemi in vivo, protože specifické epitopy jsou maskovány, **ale jsou velmi vhodné pro diagnózu Borreliózy, protože jsou zaměřeny proti vysoce konzervovaným cílovým antigenům**. Enzymoimunologickými testy (ELISA, EUROLINE-WB) lze Lymskou borreliózu diagnostikovat v 85 % případů, bez ohledu na druh, protože se detekují protilátky proti samotnému VlsE.

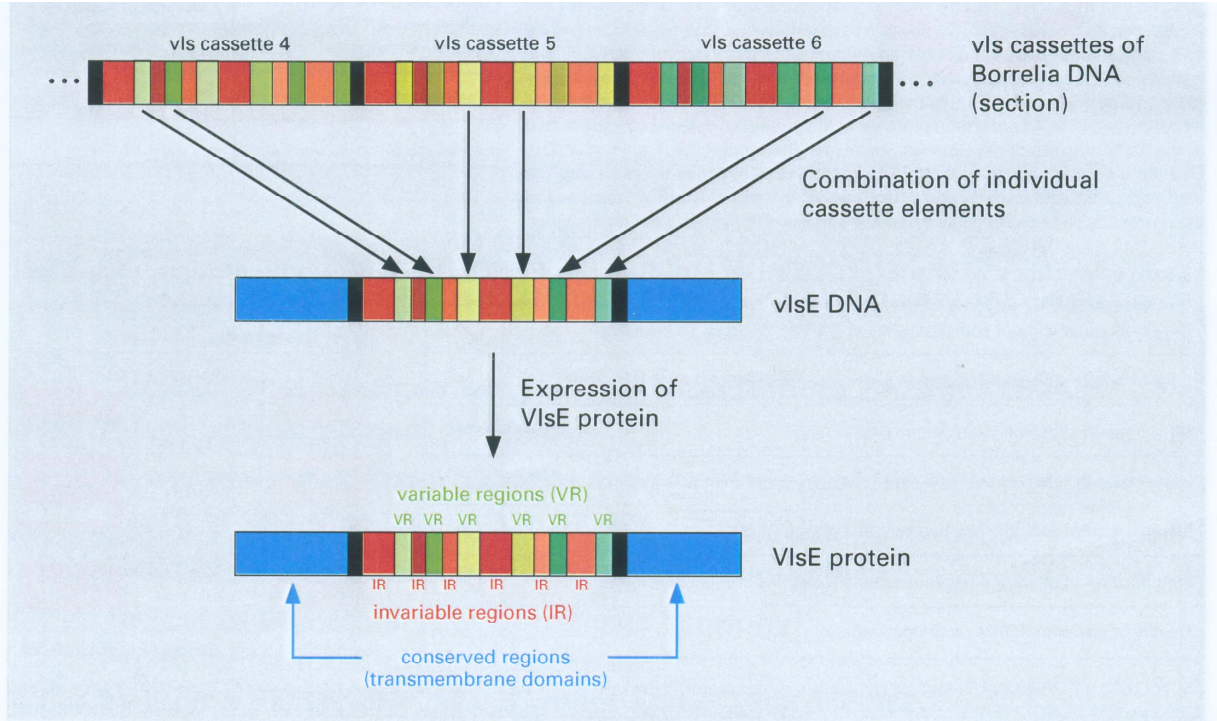


VlsE na povrchu Borrelie

Jak se generuje variabilita VlsE variabilních oblastí?

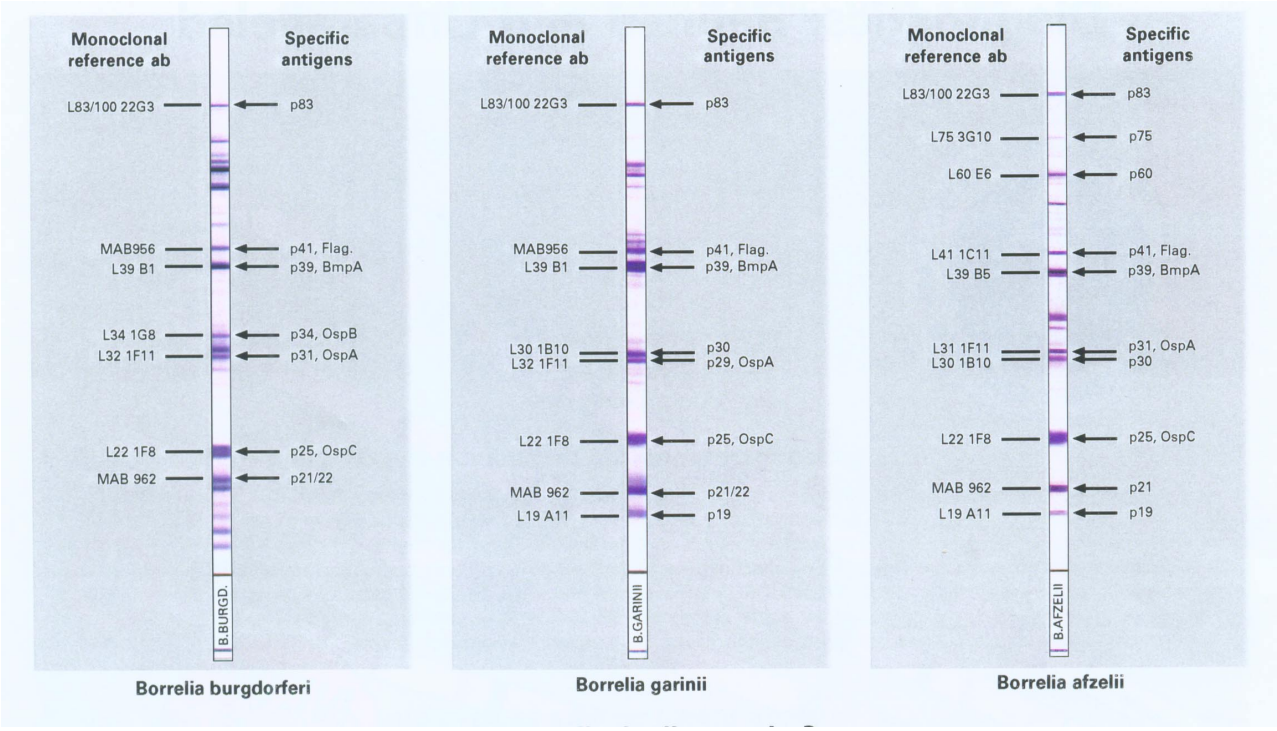
Pro přípravu VlsE proteinu slouží sekvence DNA Borrelie obsahující 15 až 20 „kazet“ tak zvaných variabilních, hlavnímu proteinu podobných sekvencí (**v**ariable major protein-**l**ike **s**equence (**vls**), které slouží jako knihovna genetické informace. Každá „kazeta“ je tvořena 12 sekcemi genu: šesti konstantními oblastmi (značeno červeně) a šesti variabilními oblastmi (značeno zeleně). Kombinováním různých elementů těchto „kazet“ (tak zvanou rekombinací) vzniká téměř nekonečný počet povrchových proteinů lišících se ve svých variabilních oblastech. DNA, která je sestavena z jednotlivých kazet a využívá se pro syntézu proteinů, se nazývá VlsE (E = exprimovaná). Může obsahovat také transmembránové domény VlsE proteinu. VlsE je exprimována výlučně *in vivo*; kultivované Borrelie tento antigen neobsahují.

Literatura: Lawrenz et al., J.Clin. Microbiol. 37: 3997-4004 (1999); Eicken et al., J.Biol.Chem. 277; 21691-21696(2002)



Rekombinace a exprese VlsE

Hlavní znaky tradičních EUROIMMUN anti-borrelia Westernblotů



Monoklonální referenční protilátka – specifické antigeny

Jakou roli hrají westernbloty v diagnostice borreliózy?

Westernbloty umožňují **sérologické určení protilátek proti lidským patogenním druhům borrelie.** Tyto druhy zahrnují B.burgdorferi, B.garinii a B.afzelii. Německá společnost pro hygienu a mikrobiologii (Deutsche Gesellschaft fur Hygiene und Mikrobiologie, DGHM), Ústav Roberta Kocha (Berlin) a Centrum pro kontrolu nemocí (Atlanta, USA) doporučují pro sérologickou diagnostiku Lymské borreliózy **dvoukrokovou strategii:** nejprve se provádí screeningový test pomocí ELISA nebo nepřímé imunofluorescence (IIFT), který by měl vykazovat vysokou citlivost. Ke kontrole specifity, pozitivních a hraničních reakcí by se poté měl použít westernblot. U čerstvých infekcí (raných stádií) se doporučuje provedení ELISA/IIFT a westernblotu paralelně, protože některé slabé reakce bývají detekovány dříve pomocí westernblotu než pomocí screeningových testů.

Kvalitativní znaky tradičních EUROIMMUN anti-borrelia westernblotů

EUROIMMUN westernbloty splňují **požadavky Německé společnosti pro hygienu a mikrobiologii** (Wilske et al., Lyme Borreliosis: Duality Standards for the Microbiological Diagnosis of Infectious Diseases (MiQ 12/200):

- **Celkový extrakt antigenů borrelie** - nezbytný předpoklad pro včasnou identifikaci čerstvých infekcí
- Jasné **oddělení specifických a nespecifických proužků antigenů**
- Charakterizace všech diagnosticky významných proužků pomocí **monoklonálních referenčních protilátek**
- **Vysoce specifická detekce IgM pomocí OspC-** žádné falešně pozitivní reakce s krví dárců
- Specifické **vyhodnocovací šablony,** přizpůsobené každému jednotlivému kitu (soupravě)
- **Jasná klasifikační kritéria pro pozitivní reakce**- reakce alespoň jednoho (IgM) nebo alespoň dvou (IgG) specifických proužků
- Pozitivní a negativní **kontrolní séra** jsou na požádání k dodání.

Extrakt celkových antigenů nebo rekombinantní antigeny?

Westernblotové systémy s výlučně rekombinantními antigeny jsou snáze vyhodnotitelné a vedly tak na některých klinikách k opuštění westernblotů využívajících celkové antigeny. **Avšak westernbloty s rekombinantními antigeny vykazují o 23 % nižší citlivost** (Wilske et al., Med.Microbiol. Immunol. 188: 139-144, 1999), **zvláště u čerstvých infekcí**. Nejsou proto pro spolehlivou diagnostiku borreliózy doporučeny. Jednotlivé rekombinantní antigeny však mohou doplňovat westernblot s celkovými antigeny. Dodatečné užití nově identifikovaného hlavního antigenu borrelie VlsE přivedlo znovu do popředí zájmu westernblot využívající celkové antigeny při klasickém vyhodnocování.

Citlivost	n	Westernblot s celkovými antigeny	Rekombinantní westernblot
Erythema migrans	66	33,3%	10,6%
Neuroborreliosis (stádium II)	42	57,1%	45,2%
Pozdní stádium borreliozy	39	100%	97,4%
Kontrolní skupina[2]	139	2,2%	2,2%

[1] Užité rekombinantní antigeny: p83/100, p39, p41i, OspC17, p58
[2] 118 dárců krve, 11 syfilitických pacientů , 10 pacientů pozitivních na revmatické faktory