

RIDASCREEN[®] Borrelia IgG, IgM

N.º do art.: K3221 (IgG)
K3231 (IgM)



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Telefone: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Utilização prevista

Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Os testes RIDASCREEN® Borrelia (K3221, K3231) são imunoenaios enzimáticos para a detecção quantitativa de anticorpos IgG ou IgM contra espécies de *Borrelia burgdorferi sensu lato* no soro humano.

O teste deve ser feito para confirmação de um caso suspeito de borreliose ou para o esclarecimento do estado imunitário.

2. Resumo e explicação do teste

A *Borrelia burgdorferi lato sensu* é composta por genoespécies patogênicas humanas conhecidas como *Borrelia afzelli*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi stricto sensu*, *Borrelia Spielman* e *Borrelia bavariensis* presente na Europa. Genoespécies como *Borrelia valaisiana* e *Borrelia lusitaniae* são consideradas como sendo potencialmente patogênicas.

Por causa da reação do sistema imunitário, ocorre, após uma infecção com borrelia, a formação de anticorpos específicos contra o agente patogénico. Estes podem ser comprovados no soro com a ajuda de métodos imunológicos. O método de teste usado e a escolha do antígeno específico do patógeno têm ambos uma importância significativa na significância do teste.

3. Princípio do teste

Os antígenos purificados são ligados a uma placa de micropoços. Nas amostras de pacientes, os anticorpos presentes ligam-se aos antígenos e são, numa segunda etapa, comprovados com anticorpos anti-humanos marcados com enzima (conjugado). Através da enzima, um substrato sem cor (H₂O₂/TMB) é convertido num produto final azul. A reação enzimática é parada com a adição de ácido sulfúrico. Simultaneamente, ocorre a mudança de cor de azul para amarelo. A medição final é realizada a 450 nm num fotómetro, usando um comprimento de onda de referência de ≥ 620 nm.

4. Reagentes fornecidos

Tabela 1: Conteúdo da embalagem (os reagentes de uma embalagem são suficientes para 96 testes)

			K3221 IgG	K3231 IgM
Plate	96 testes	Placa de micropoços; 12 tiras de micropoços (quebráveis) no suporte de tiras; revestido com um antígeno nativo de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> (<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i>) e recombinante OspC de <i>B. afzelii</i> (estirpe PKO)	X	X
Diluent	110 ml	Tampão de amostra, pronto a utilizar; sol. de NaCl tamponada com fosfato, de cor amarela; contém lisato de <i>Treponema phagedenis</i> para a absorção de anticorpos de reacção cruzada contra outras espiroquetas (spirochaetes)	X	X
SeroWP	100 ml	Tampão de lavagem, concentrado 10 vezes; solução de NaCl tamponada com tris	X	X
Control IgG + Tampa verde	2,5 ml	Controlo padrão IgG, pronto a usar; soro humano diluído; de cor verde	X	
Control IgM + Tampa vermelha	2,5 ml	Controlo padrão IgM, pronto a usar; soro humano diluído; de cor vermelha		X
Control IgG - Tampa transparente	1,2 ml	Controlo negativo IgG, pronto a usar; soro humano diluído	X	
Control IgM - Tampa transparente	1,2 ml	Controlo negativo IgM, pronto a usar; soro humano diluído		X
Control IgG A Tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgG, pronto para o uso; soro humano diluído	X	
Control IgM A Tampa verde	1,2 ml	Controlo de qualidade A IgM, pronto para o uso; soro humano diluído	X	
Control IgG B Tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgG, pronto para o uso; soro humano diluído		X
Control IgM B Tampa vermelha	1,2 ml	Controlo de qualidade B IgM, pronto para o uso; soro humano diluído		X
SeroG LD Tampa verde	12 ml	Conjugado anti-humano IgG LD (cabra), pronto a usar; anticorpos conjugados em peroxidase em solução proteica estabilizada	X	
SeroM HD Tampa vermelha	12 ml	Conjugado anti-humano IgM HD (cabra), pronto a usar; anticorpos conjugados em peroxidase em solução proteica estabilizada		X
SeroSC	12 ml	Substrato; H ₂ O ₂ /tetrametilbenzidina; pronto a usar	X	X
Stop	12 ml	Reagente de paragem 1 N ácido sulfúrico; pronto a usar	X	X

Detalhes sobre substâncias perigosas de acordo com as obrigações de rotulagem. Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

5. Reagentes e sua armazenagem

O kit deve ser armazenado de 2 - 8 °C e pode ser utilizado até a data de validade impressa no rótulo. Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou por uma semana quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C). A garantia do kit não é válida após o vencimento do kit.

O saco de alumínio, no qual a placa de micropoços se encontra, deve ser aberto de modo que o fecho clip não seja arrancado. As tiras não necessárias devem ser guardadas de imediato no saco de alumínio fechado e armazenadas entre 2 - 8 °C.

A contaminação dos reagentes deve ser evitada, e o substrato incolor deve ser protegido da luz directa.

6. Reagentes adicionais necessários, e equipamento necessário

6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

6.2. Acessórios

- Incubador a 37 °C
- Tubos de amostra
- Vortex
- Micropipetas para volumes de 10 – 100 µl e 100 – 1000 µl
- Proveta graduada (1000 ml)
- Cronômetro
- Aparelho de lavagem para as microplacas ou pipetas de vários canais
- Fotômetro para as microplacas (450 nm, filtro de referência ≥ 620 nm)
- Filtro de papel (lenços de laboratório)
- Contentor para lixo com uma solução de hipoclorito de 0,5%

7. Precauções para utilizadores

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. O manual de instruções relativo ao procedimento de ensaio deve ser seguido. Não pipete amostras ou reagentes com a boca. Evite o contato com a pele ferida ou membranas mucosas. Ao manusear reagentes ou amostras, use roupas de segurança adequadas (luvas apropriadas, jaleco, óculos de segurança) e lave suas mãos após o término do procedimento de ensaio. Não fume, coma ou beba nas áreas onde estão sendo usados amostras ou reagentes.

Os soros de controle contidos no kit (controle padrão, controle negativo, controle de qualidade A e controle de qualidade B) foram testados para HIV e HCV-Ak, bem como HbsAg, e considerados negativos. Porém, eles devem, bem como as amostras de pacientes e todos os materiais que entrem em contato com eles, ser considerados como potencialmente infecciosos e manejados de acordo com as respectivas regras de segurança nacionais.

Para mais informações, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com

Todos os reagentes e materiais utilizados devem ser descartados corretamente após o uso. Consulte os regulamentos nacionais relevantes para a eliminação.

8. Colheita e conservação de amostras

O teste foi desenvolvido para exame de amostras de soro humano. Após a colheita de sangue, o sangue deve ser rapidamente separado de coágulos para evitar uma hemólise do soro. As amostras devem ser armazenadas frias ou congeladas até serem usadas para o teste. Deve-se evitar um novo congelamento e descongelamento, bem como a contaminação microbiana. A utilização de amostras turvas, ictéricas, hemolíticas, lipemicas ou inactivadas pelo calor pode produzir falsos resultados.

Tabela 3: Conservação de amostras

soro não diluído		Soro diluído
2 – 8 °C	-20 °C	2 – 8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Procedimento de teste

9.1. Generalidades

Todos os reagentes e a placa de micropoços devem atingir a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes da utilização. As tiras só devem ser retiradas do saco de alumínio após a temperatura ambiente ter sido alcançada. Os reagentes devem ser cuidadosamente misturados imediatamente antes da utilização. Após a utilização, o kit deve ser imediatamente conservado entre 2 - 8 °C.

Só deve ser retirada a quantidade de reagente necessária para a execução do teste. O reagente restante não deve ser colocado novamente nos frascos, uma vez que tal pode levar a uma contaminação.

As tiras não podem ser usadas mais de uma vez. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser utilizados, se a embalagem estiver danificada ou os frascos com derrames.

Alguns dos reagentes contidos no kit não são específicos do teste. Os reagentes rotulados com Sero (por ex. **SeroWP**) podem também ser utilizados noutros ensaios ELISA RIDASCREEN® Sero com os respectivos reagentes.

Os soros de controlo são específicos do lote. Não é permitida a substituição dos soros de controlo entre kits de números de lotes diferentes.

RIDASCREEN® Sero ELISA controlos de qualidade A e B, são fornecidos como componentes adicionais aos respectivos kits RIDASCREEN® Sero ELISA. São controlos propostos para um controlo de qualidade adicional que podem ser utilizados como opção. Contêm soro humano de controlo com diferentes concentrações de anticorpos.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte de concentrado de tampão de lavagem **SeroWP** é misturada com 9 partes de água destilada. Para tal, coloca-se 100 ml do concentrado numa proveta graduada de 1000 ml e enche-se com água destilada até perfazer 1000 ml. Os cristais eventualmente presentes no concentrado devem ser dissolvidos anteriormente por meio de calor (banho-maria a 37 °C). Solução de lavagem diluída pode ser utilizada por no máximo 4 semanas quando armazenadas de 2 - 8 °C ou por uma semana quando armazenados em temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.3. Preparação de amostras

9.3.1. Teste de soro

As amostras de soro a testar são diluídas a 1:100 antes do início do teste com o tampão de amostras **Diluent**.

por ex., 10 µl de soro + 990 µl **Diluent**

Para o doseamento de IgM, recomenda-se antes do teste, um pré tratamento dos soros para uma absorção de IgG (p. ex. com o RIDA® RF-Absorbens, nº do art. Z0202).

Atenção!

O controle negativo e controle padrão, controle de qualidade A e controle de qualidade B estão prontos para uso e não devem ser diluídos ou absorvidos.

9.4. Primeira incubação

Após a inserção de um número suficiente de poços nos quadros de suporte, são pipetados 100 µl das amostras diluídas e 100 µl dos controlos prontos a utilizar em cada um dos respectivos poços, deixando a posição A1 livre (valor em branco do reagente).

O controle negativo **Control IgG | -** ou **Control IgM | -** é executado simples e o controle padrão **Control IgG | +** ou **Control IgM | +** em duplicado. Adicionar o controles de qualidade **Control IgG | A** e **Control IgG | B** ou **Control IgM | A** e **Control IgM | B** uma vez. Cubra a placa e incube a 37 °C durante 30 minutos num incubador. Durante este processo, os fundos dos poços não devem entrar em contacto com materiais condutores de calor (tais como metais ou papel húmido). A placa de micropoços deve estar coberta durante a incubação.

A1	Valor em branco do reagente
B1	Controle negativo
C1	Controle padrão
D1	Controle padrão
E1	Controle de qualidade A
F1	Controle de qualidade B
G1, H1	Soro do paciente 1, 2, etc.

Aviso!

A placa de micropoços não deve ser colocada num contentor de incubação frio, que só atinja 37 °C durante a incubação. A temperatura do recipiente deve ser previamente regulada para 37 °C.

9.5. Lavagem

Os poços devem ser esvaziados num contentor de resíduos, contendo solução de hipoclorito de sódio para desinfecção. Em seguida, bata as placas em papel absorvente, a fim de remover a humidade residual. Após este procedimento, lave a placa 4 vezes, usando 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Certifique-se de que os poços estão completamente esvaziados, batendo com os mesmos numa parte não usada do papel absorvente, após cada lavagem.

Ao utilizar uma máquina de lavagem de microplacas, deve-se verificar o ajuste correcto do equipamento ao tipo de placa utilizado. Após a lavagem, bata com a placa em papel absorvente limpo, a fim de remover a humidade residual.

9.6. Segunda incubação

Adição de 100 µl do conjugado anti-humano IgG LD **SeroG LD** ou conjugado anti-humano IgM HD **SeroM HD** nos respectivos poços (inclusive A1). Seguidamente, cobrir a placa e incubar a 37 °C durante 30 minutos num incubador (veja o ponto 9.4).

9.7. Lavagem

Lavar 4 vezes de acordo com o ponto 9.5.

9.8. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato **SeroSC** a cada poço. Em seguida, cubra a placa e incube a 37 °C durante 30 minutos num incubador. Em seguida, a reacção é parada com a adição de 100 µl de reagente de paragem **Stop** a cada poço. Depois de mexer cuidadosamente (batendo levemente na parte lateral da placa), meça a absorvância a 450 nm (comprimento de onda de referência ≥ 620 nm) num fotómetro para placas. Calibre a zero o valor em branco do reagente (posição A1).

10. Controlo de qualidade e indicações de instabilidade ou deterioração

Para efeitos de controlo de qualidade, o controlo padrão (em duplicado) e o controlo negativo devem ser usados de cada vez que o teste é realizado. O teste foi executado correctamente, se o valor médio de absorvância do controlo padrão a 450/620 nm estiver dentro da faixa de valores indicados na folha de dados anexa. Se as duas medições individuais apresentarem desvios do valor médio de mais de 20%, o teste deve ser feito novamente. O controlo negativo deve indicar um valor de absorvância de $< 0,3$ a 450/620 nm.

Os controlos de qualidade A e B do RIDASCREEN® Sero ELISA são controlos de qualidade adicionais que podem ser usados como opção.

Os valores alvo estão indicados no certificado de garantia de qualidade que está incluído no lote específico. Os valores obtidos (U/ml, UI/ml ou mUI/ml) são recomendados como valores de referência para garantia de qualidade em laboratórios acreditados.

Um desvio dos valores necessários, bem como a cor turva do reagente ou a coloração azul do substrato antes da adição nos poços, pode ser uma indicação de expiração do reagente.

Se não forem obtidos os valores estipulados, devem ser verificados os seguintes pontos antes de repetir o teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento que está a ser usado (por ex., calibração)
- Procedimento de teste correcto
- Inspeção visual dos componentes do kit para determinar se há contaminação ou fuga; uma solução de substrato que tenha ficado azul não pode ser utilizada.

Se as condições continuarem a não ser satisfatórias após a repetição do teste, contacte o distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

A avaliação do teste pode ser feita de três modos diferentes:

1. Utilizando a curva padrão anexa
2. Utilizando a tabela de valores na folha de dados
3. Matematicamente, utilizando o método dos 4 parâmetros ou o método α .

O valor em branco do reagente deve ser subtraído de cada um dos valores de absorvância antes da avaliação.

11.1. Determinação dos valores unitários através da curva padrão

Para efectuar uma avaliação através da curva padrão, deve ser feita uma correcção do valor médio do controlo padrão, a fim de ter em conta quaisquer flutuações passíveis de ocorrer de um dia para o outro. O factor de correcção F é calculado a partir do valor médio actual medido do controlo padrão e do seu valor alvo. O valor alvo, que depende do lote, é indicado na folha de dados anexa.

$$F = \frac{\text{valor alvo do controlo padrão}}{\text{valor de absorvância médio do controlo padrão}}$$

Todos os valores de DO das amostras são multiplicados pelo factor F. Com os valores corrigidos, o respectivo valor U/ml é lido na curva padrão.

11.2. Determinação dos valores unitários através da tabela de valores

	U/ml	Intervalo de valores para o controlo padrão		
			1,00 - 1,05	
-	< 10,0		< 0,22	
?	10,0 - 14,0		0,22 - 0,31	
+	14,1 - 30,0		0,32 - 0,62	
	30,1 - 60,0		0,63 - 1,06	
	60,1 - 100,0		1,07 - 1,42	
	100,1 - 200,0		1,43 - 1,81	
	200,1 - 400,0		1,82 - 2,05	
	> 400,0		> 2,05	

Figura 1: Exemplo de uma determinação de IgG
(Extracto de uma folha de dados específica do lote)

A absorvância média do controlo padrão é usada para identificar na tabela de valores a coluna com o intervalo de valores que é válido para a medição actual. Isto tem em conta a flutuação diária do ciclo de teste. Assim, já não é necessário utilizar o factor de correcção. A absorvância da amostra medida é designada no intervalo de valores adequado e o título em U/ml é lido a partir da segunda coluna a contar da esquerda na tabela.

Por exemplo, o valor de absorvância médio do controlo padrão para uma determinada medição é 1,02. Neste caso, a coluna da tabela com a variação de valores 1,00 – 1,05 é a que deve ser usada para determinar os resultados. Uma amostra de paciente com um valor de absorvância de 1,38 corresponde, portanto, ao intervalo de variação do título de 60,1 a 100,0 U/ml. (Os valores citados devem ser encarados como exemplos e podem diferir dos valores actuais da folha de dados.)

A avaliação dos valores obtidos (positivo (+), negativo (-) ou duvidoso (?)) é vista na primeira coluna da tabela de valores.

11.3. Avaliação matemática

Os valores necessários para uma avaliação matemática de acordo com o método dos 4 parâmetros ou com o método α são indicados na folha de dados anexa.

11.4. Resultado do teste

Tabela 4: Avaliação das unidades determinadas

	IgG	IgM
Negativo	< 10 U/ml	< 12 U/ml
Duvidoso	10 - 14 U/ml	12 - 17 U/ml
Positivo	> 14 U/ml	> 17 U/ml

12. Limitações do método

Os ensaios RIDASCREEN® Borrelia ELISA detectam anticorpos IgG ou IgM anti borrelia. O teste não pode ser usado para inferir uma relação entre a extinção determinada e a ocorrência de sintomas clínicos graves. Os resultados obtidos devem ser sempre interpretados em combinação com o quadro clínico.

O tampão de amostra contém o antigénio de *Treponema phagedenis* para a absorção de anticorpos de reacção cruzada, conforme descrito na literatura técnica para as espiroquetas (spirochaetes). Deste modo, excluem-se o mais possível resultados falso positivos devidos a reacções com anticorpos, que não sejam específicos para o *B. burgdorferi s.l.*

Um resultado negativo não significa necessariamente, que não existe qualquer infecção. Durante a fase inicial da infecção, o número de anticorpos pode ser ainda tão pequeno que o resultado do teste é negativo. No caso de infecção por borrelia, os anticorpos IgM podem ser detectados 5 dias após uma picada de carraça. Assim, uma amostra de soro colhida logo após a picada de carraça não é adequada para a detecção de uma infecção recente, mesmo que o teste IgG apresente um resultado positivo ou duvidoso (cicatriz sorológica). Mesmo na fase II da doença, em até 30% dos doentes não se encontram níveis de anticorpos que possam ser medidos. Deste modo, se existir a suspeita clínica, deve ser testado um soro de seguimento.

No exame de pares de soros, um resultado IgM positivo deve ser considerado como uma indicação de infecção activa, bem como um aumento significativo do título.

Se o ensaio ELISA for usado como controlo da terapêutica, deve-se considerar que, apesar da terapêutica bem sucedida, muitas vezes as reduções dos títulos só podem ser verificadas após vários meses. Neste caso, os anticorpos IgM também podem persistir.

Geralmente, para uma melhor qualidade do diagnóstico, nos exames sorológicos devem ser examinadas duas amostras de soro consecutivas do paciente. Importante para a interpretação dos resultados é o progresso do título.

Um resultado positivo não exclui a presença de outro patógeno infeccioso como causa da doença.

13. Características de desempenho

Tabela 5: Variação entre ensaios (n = 30)

<u>Varição entre ensaios</u>	<u>IgG</u>		<u>IgM</u>	
	DO	CV	DO	CV
Soro 1	0,126	8,6%	0,150	4,1%
Soro 2	0,488	7,5%	0,502	4,8%
Soro 3	0,956	3,8%	1,216	6,3%

Tabela 6: Variação entre ensaios (n = 24)

<u>Variação entre ensaios</u>	<u>IgG</u>		<u>IgM</u>	
	DO	CV	DO	CV
Soro 1	0,143	5,3%	0,176	3,1%
Soro 2	0,550	3,3%	0,589	2,4%
Soro 3	1,089	3,3%	0,989	1,8%

Tabela 7: Sensibilidade e especificidade em comparação com outros dois ELISAs comercializados

n=80	IgG	IgM
Sensibilidade	100,0%	100,0%
Especificidade	97,4%	93,6%

Tabela 8: Resultados com 200 soros de doadores examinados de um centro de doação de sangue na Alemanha

soros de 200 doadores de sangue	IgG	IgM
Negativo	88,5%	93,5%
Duvidoso	5,5%	3,0%
Positivo	6,0%	3,5%

Bibliografia

1. Agüero-Rosenfeld, M.E., et al.: Evolution of the Serologic responses to *Borrelia burgdorferi* in Treated Patients with Culture-Confirmed Erythema Migrans. *J.Clin.Microbiol.* 34, 1 – 9 (1996)
2. Hauser, U., Wilske, B.: Enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant internal flagellin fragments derived from different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* for the serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Med. Microbiol. Immunol.* 186, 145 – 151 (1997)
3. Hilton, E., et al.: Temporal Study of Immunoglobulin M Seroactivity to *Borrelia burgdorferi* in Patients treated for Lyme Borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 35, 3, 774 – 776 (1997)
4. Hubalek, Z., Halouzka, J.: Distribution of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology* 13, 951 – 957 (1997)
5. Kaiser, R., et al.: Prevalence of Antibodies to *Borrelia burgdorferi* and Tick-borne Encephalitis Virus in an Endemic Region in Southern Germany. *Zbl. Bakt.* 286, 534 – 541 (1997)
6. Kamradt, T., et al.: Die Lyme-Arthritis; Klinik, Diagnose und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 95, 5, 214 – 219 (1998)
7. Köhler, W.: Lyme-Borreliose. *Immun. Infekt.* 2, 144 – 148 (1998)
8. Reiber, H.: Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab. Med.* 19: 444-462 (1995)
9. Wilske, B. et al.: MiQ 12 – Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer (2000)
10. Wilske, B.: Mikrobiologische Diagnostik der Lyme Borreliose. *Hygiene und Mikrobiologie* 3/98, 22 – 25 (1998)
11. Wilske, B., et al.: Phenotypic Analysis of Outer Surface Protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by Monoclonal Antibodies: Relationship to Genospecies and OspA Serotype. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1, 103 – 109 (1995)
12. Erkrankungen an Lyme-Borreliose in den Jahren 1994 – 1996, Erhebung in den neuen Bundesländern. *Bericht Bundesgesundhbl.* 12/97, 486 – 491 (1997)
13. Leitlinien: Diagnostik der Lyme-Borreliose. *Mikrobiologie* 8, S. 213 (1998)
14. Lyme-Borreliose. *Deutsches Ärzteblatt* 95, 25, 1587 – 1588 (1998)
15. Merkblatt für Ärzte: Lyme-Borreliose – Erkennung und Verhütung. *Bundesgesundhbl.* 11/96, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin und Robert Koch-Institut, 436 – 438 (1996)