

## **VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA (Borrelia + VlsE IgG EU ELISA)**

Referencia: EC024G00 Código de color: dorado/rojo

### **Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards**

Referencia: EC022L60

### **Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set**

Referencia: EN022L65

**EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO**

**VIROTECH Diagnostics GmbH**

**Löwenplatz 5**

**D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0**

**Fax: +49-6142-966613**

**<http://www.virotechdiagnostics.com>**



Freigabedatum: 21.3.2019

REV 10 / VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA ES

# Índice

|                                                                                                       |          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1. Finalidad de la prueba.....</b>                                                                 | <b>3</b> |
| <b>2. Principio de la prueba .....</b>                                                                | <b>3</b> |
| <b>3. Contenido .....</b>                                                                             | <b>3</b> |
| 3.1 Contenido (kit de ensayo IgG) .....                                                               | 3        |
| 3.2 Contenido (patrones IgG para líquido cefalorraquídeo).....                                        | 3        |
| <b>4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar</b> | <b>3</b> |
| <b>5. Medidas de precaución y advertencias .....</b>                                                  | <b>4</b> |
| <b>6. Material adicional necesario (no suministrado).....</b>                                         | <b>4</b> |
| <b>7. Realización de la prueba.....</b>                                                               | <b>4</b> |
| 7.1 Material de muestra.....                                                                          | 4        |
| 7.2 Preparación de los reactivos.....                                                                 | 4        |
| 7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH .....                                                  | 5        |
| 7.4 Empleo de procesadores ELISA.....                                                                 | 5        |
| <b>8. Valoración del ensayo.....</b>                                                                  | <b>5</b> |
| 8.1 Control del funcionamiento del ensayo: .....                                                      | 5        |
| 8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE).....                                                        | 6        |
| 8.3 Esquema de valoración para IgG .....                                                              | 6        |
| 8.4 Limitaciones del ensayo .....                                                                     | 6        |
| <b>9. Bibliografía .....</b>                                                                          | <b>6</b> |
| <b>10. Esquema de la realización de la prueba.....</b>                                                | <b>8</b> |

## 1. Finalidad de la prueba

La prueba ELISA B. afzelii+VlsE IgG Europe (cepa PKo) sirve, como ensayo de búsqueda (screening test), para la detección semicuantitativa y cualitativa de anticuerpos IgG contra *Borrelia burgdorferi* sensu lato en el suero humano, permitiendo a la vez, por medio de una investigación paralela de pares de suero de líquido cefalorraquídeo, aportar una prueba cuantitativa de síntesis de anticuerpos IgG e IgM propios del SNC.

## 2. Principio de la prueba

El anticuerpo buscado en el suero humano forma un complejo inmune con el antígeno fijado en la placa de microtitulación. Las inmunoglobulinas no ligadas son eliminadas mediante procesos de lavado. El conjugado enzimático se liga al citado complejo. Las inmunoglobulinas no ligadas son de nuevo eliminadas mediante procesos de lavado. Tras la adición de la solución de sustrato (TMB), la actividad enzimática (peroxidasa) da lugar a un pigmento azul, que adopta un color amarillo después de añadir la solución de paro.

## 3. Contenido

### 3.1 Contenido (kit de ensayo IgG)

1. **1 placa de microtitulación**, que consta de 96 cavidades individuales separables recubiertas con antígeno liofilizado
2. **Tampón de dilución PBS (azul, listo para utilizar), 2x50ml**, pH 7,2, con conservante y Tween 20
3. **Tampón de lavado PBS (concentración 20x), 50 ml** pH 7,2, con conservante y Tween 20
4. **Control negativo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
5. **Control cut-off para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
6. **Control positivo para IgG, 2000µl**, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para utilizar
7. **Conjugado IgG (anti-humano), 11ml**, conjugado de peroxidasa de rábano picante (ovino o cabra) con estabilizadores de proteínas y conservante en tampón Tris, listo para utilizar
8. **Solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB 3,3',3'',5''), 11ml**, lista para utilizar
9. **Solución de paro de citrato, 6ml**, contiene una mezcla de ácidos

### 3.2 Contenido (patrones IgG para líquido cefalorraquídeo)

**Patrones ELISA IgG de Borrelia** para la cuantificación de las concentraciones de anticuerpos específicos contra patógenos determinados, 4 frascos con 1000 µl cada uno, suero humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listos para usar, 100 UMA; 25 UMA; 6,2 UMA; 1,5 UMA (UMA = unidades de medición arbitrarias).

## 4. Conservación y plazo de caducidad del kit de ensayo y de los reactivos listos para utilizar

Conserve el kit de ensayo a 2-8°C. El plazo de caducidad de cada componente figura en la correspondiente etiqueta; el plazo de caducidad del kit puede consultarse en el certificado de control de calidad.

1. Una vez separados los pocillos individuales necesarios conserve los restantes pocillos / tiras en la bolsa cerrada con desecante a una temperatura de 2-8°C. Los reactivos deben volverse a guardar a 2-8°C inmediatamente después de su uso.
2. El conjugado listo para utilizar y la solución de sustrato TMB son fotosensibles y deben conservarse en la oscuridad. Si la solución de sustrato se tiñe por efecto de la luz, debe desecharse.
3. Extraiga únicamente la cantidad de conjugado listo para utilizar o de TMB necesaria para la prueba. El exceso de conjugado o TMB extraído no debe devolverse, sino que debe ser desechado.

| Material                         | Estado                       | Almacenamiento                                                                   | Durabilidad |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Muestras de análisis             | diluidas                     | de +2 hasta +8°C                                                                 | máx. 6h     |
|                                  | sin diluir                   | de +2 hasta +8°C                                                                 | 1 semana    |
| Controles                        | tras la apertura             | de +2 hasta +8°C                                                                 | 3 meses     |
| Placa de microtitulación         | tras la apertura             | de +2 hasta +8° (almacenamiento en la bolsa suministrada con bolsita de secante) | 3 meses     |
| Absorbente del factor reumatoide | sin diluir, tras la apertura | de +2 hasta +8°C                                                                 | 3 meses     |
|                                  | diluido                      | de +2 hasta +8°C                                                                 | 1 semana    |

|                           |                                    |                                            |           |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------|-----------|
| Conjugado                 | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz) | 3 meses   |
| Tetrametilbencidina (TMB) | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz) | 3 meses   |
| Solución de parada        | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C                           | 3 meses   |
| Solución de lavado        | tras la apertura                   | de +2 hasta +8°C                           | 3 meses   |
|                           | dilución final (lista para el uso) | de +2 hasta +25°C                          | 4 semanas |

## 5. Medidas de precaución y advertencias

1. Como sueros de control sólo deben utilizarse sueros que hayan dado resultado negativo en las pruebas de anticuerpos VIH1, anticuerpos VIH2, anticuerpos VHC y antígeno de superficie de la hepatitis B. En cualquier caso, todas las muestras, muestras diluidas, controles, conjugados y tiras de microtitulación deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Los componentes que contienen conservante, así como la solución de parada de citrato y la TMB, son irritantes para la piel, los ojos y las mucosas. En caso de contacto, lave inmediatamente la parte afectada con abundante agua y acuda al médico si fuera necesario.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.

## 6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Agua destilada/desionizada
2. Pipeta multicanal 50µl, 100µl
3. Micropipetas: 10µl, 100µl, 1000µl
4. Tubos de ensayo
5. Servilletas de celulosa
6. Cubierta para placas ELISA
7. Recipientes para residuos infecciosos
8. Aparato de lavado manual para ELISA o aparato de lavado automático para placas de microtitulación
9. Espectrofotómetro para placas de microtitulación con filtro de 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm)
10. Estufa de incubación

## 7. Realización de la prueba

El cumplimiento exacto de las instrucciones de VIROTECH Diagnostics es el requisito previo para obtener resultados correctos.

### 7.1 Material de muestra

Como material de análisis es posible utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el prospecto sólo se mencione el suero.

Las diluciones de pacientes siempre deben prepararse frescas.

Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse. Evítese una descongelación repetida.

1. Sólo deben utilizarse sueros recientes no inactivados.
2. No deben emplearse muestras hiperlipémicas, hemolíticas o con contaminación microbiana ni sueros que presenten turbidez (riesgo de falsos positivos o negativos).

### 7.2 Preparación de los reactivos

El sistema de diagnóstico de VIROTECH Diagnostics ofrece una gran flexibilidad al permitir el uso de los mismos tampones de dilución y lavado, TMB, solución de paro de citrato y conjugado para todos los parámetros y lotes. Los controles listos para utilizar (control positivo, control de nivel de corte, control negativo) son específicos para cada parámetro y deben emplearse exclusivamente con el lote de placas indicado en el certificado de control de calidad.

1. Seleccione una temperatura de 37°C en la estufa y cerciórese de que se ha alcanzado dicha temperatura antes de comenzar la incubación.
2. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el envase con las tiras de prueba.
3. Agite bien todos los componentes líquidos antes de su uso.

4. Completar el concentrado de solución de lavado a 1 litro con agua destilada/desionizada (en caso de una eventual formación de cristales en el concentrado, éste debe llevarse a temperatura ambiente antes de la dilución, agitándolo bien antes del uso).

### 7.3 Realización de la prueba ELISA de VIROTECH

1. Para cada prueba, pipetee 100µl del tampón de dilución listo para utilizar (valor cero), del control negativo, del control cut-off y del control positivo para IgG, así como de los sueros de paciente diluidos. Recomendamos ensayar duplicados en cada caso (valor cero, controles y sueros de paciente); en el caso del control cut-off, la preparación de duplicados imprescindible. Dilución de trabajo de los sueros de paciente: 1+100; p.ej. 10µl de suero + 1ml de tampón de dilución.
2. Tras el pipeteado tiene lugar la incubación a 37 °C (con cubierta) durante 30 min.
3. El periodo de incubación finaliza con 4 lavados utilizando cada vez 350-400µl de solución de lavado por cavidad. No deje solución de lavado en los pocillos: retire los últimos restos de líquido sacudiendo sobre una superficie de celulosa.
4. Pipetee en todas las cavidades 100µl del conjugado listo para utilizar.
5. Incubación de los conjugados: 30 min. a 37°C (con cubierta).
6. Finalización de la incubación de los conjugados con 4 lavados (véase el punto 3).
7. Pipetee en cada pocillo 100µl de la solución de sustrato TMB lista para utilizar.
8. Incubación de la solución de sustrato: 30 minutos a 37°C (con cubierta, en la oscuridad).
9. Paro de la reacción de sustrato: pipetee en cada pocillo 50µl de la solución de parada de citrato. Agite cuidadosamente la placa hasta que los líquidos se hayan mezclado por completo y pueda verse un color amarillo uniforme.
10. Mida la absorbancia a 450/620 nm (longitud de onda de referencia 620-690nm). Ajuste el fotómetro de modo que se reste el valor obtenido para el valor cero de todos los demás valores de absorbancia. La medición fotométrica debe realizarse en la hora siguiente a la adición de la solución de paro.

Véase esquema de la realización de la prueba en la última página

### 7.4 Empleo de procesadores ELISA

Todas las pruebas ELISA de VIROTECH Diagnostics pueden realizarse con ayuda de procesadores ELISA. El usuario está obligado a validar periódicamente el aparato.

VIROTECH Diagnostics recomienda el siguiente procedimiento:

1. Al instalar el aparato, o en caso de reparaciones importantes de su procesador ELISA, VIROTECH Diagnostics recomienda validarlo según las instrucciones del fabricante.
2. Se recomienda comprobar seguidamente el procesador ELISA con el kit de validación (EC250.00). Esta comprobación periódica con el kit de validación debe realizarse al menos una vez al trimestre.
3. En cada ciclo de prueba deben cumplirse los criterios de autorización del certificado de control de calidad del producto. Este modo de procedimiento garantiza la función impecable de su procesador ELISA, sirviendo además para el aseguramiento de calidad del laboratorio.

## 8. Valoración del ensayo

Los controles listos para utilizar sirven para una determinación semicuantitativa de los anticuerpos específicos IgG e IgM, cuya concentración se indica en unidades VIROTECH (VE). Las fluctuaciones debidas a la realización de la prueba se compensan con el método de cálculo, con lo que se alcanza una elevada reproducibilidad. Para el cálculo del valor VE se emplean los valores medios de las densidades ópticas.

### 8.1 Control del funcionamiento del ensayo:

#### a) Valores de densidad óptica

El valor de densidad óptica correspondiente al valor cero debe ser inferior a 0,15.

Los valores de densidad óptica (DO) de los controles negativos deben estar por debajo de los valores de DO indicados en el certificado de control de calidad, mientras que los valores de DO de los controles positivos y del cut -off deben estar por encima de los valores de DO indicados en el certificado.

#### b) Unidades VIROTECH (VE)

Las unidades VIROTECH (VE) de los controles cut-off se definen como 10 VE. Los VE calculados para los controles positivos deben estar dentro de los intervalos indicados en el certificado de control de calidad.

Si no se cumplen estas exigencias (valores de DO, VE), debe repetirse la prueba.

## 8.2 Cálculo de las unidades VIROTECH (VE)

La absorbancia correspondiente al valor cero (450/620 nm) debe restarse de todos los valores de absorbancia.

$$VE_{(\text{control positivo})} = \frac{DO_{(\text{control positivo})}}{DO_{(\text{control de nivel de corte})}} \times 10$$
$$VE_{(\text{suero del paciente})} = \frac{DO_{(\text{suero del paciente})}}{DO_{(\text{cut - off})}} \times 10$$

## 8.3 Esquema de valoración para IgG

| Resultado (VE) | Valoración   |
|----------------|--------------|
| < 9,0          | negativo     |
| 9,0 - 11,0     | valor límite |
| > 11,0         | positivo     |

1. Si las VE calculadas para la muestra están por encima de la zona dudosa, la muestra se considera positiva.
2. Si las VE se encuentran dentro de la zona dudosa, no existe una concentración de anticuerpos significativamente alta, por lo que se considera que las muestras presentan un carácter límite. Para la determinación segura de una infección es necesario determinar el nivel de anticuerpos de dos muestras de suero: Una muestra debe tomarse inmediatamente tras el comienzo de la infección, y otra 5-10 días después (suero de convalecencia). La concentración de anticuerpos de ambas muestras debe determinarse en paralelo, es decir, en una misma prueba. No es posible un diagnóstico correcto a partir de la valoración de una única muestra de suero.
3. Si los valores medidos se encuentran por debajo de la zona dudosa, la muestra no contiene anticuerpos detectables específicos para el antígeno en cuestión. La muestra se considera negativa.

## 8.4 Limitaciones del ensayo

1. La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y los otros resultados analíticos que puedan existir.
2. La reacción cruzada entre *Borrelia* y otras espiroquetas puede dar lugar a un falso positivo. Los sueros de pacientes con las siguientes infecciones pueden presentar reacciones cruzadas: sífilis (*Treponema pallidum*), frambesia (*Treponema pertenue*), fiebre recurrente (*Borrelia* esp.), leptospirosis (*Leptospira* esp.). También pueden producirse reacciones cruzadas en caso de herpes (CMV, HSV, parvovirus) (12, 13).
3. En el transcurso de una infección por el VEB (mononucleosis infecciosa) se puede producir una formación no específica de anticuerpos Anti-*Borrelia*, sobre todo de la clase IgM (12, 13).

## 9. Bibliografía

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
2. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. 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.
4. Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis ñ Problems of Serological Diagnosis, Infection 24, No. 6 :470-472.
5. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54.
7. Hansen, K. (1993), Laboratory Diagnostic Methods in Lyme Borreliosis, Elsevier Science Publishing Co., Inc.:12.
8. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion, Clin.Lab. 44: 897-902.
9. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Evaluation of Fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis, Eur.J. Microbiol.Infect.Dis 18: 551-560.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130.
14. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
15. Oschmann und Kraiczy (1998) Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag 48-67.
16. Wilske et al. MiQ12/2000; Urban&Fischer
17. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
18. Lawrenz, M.B. et al.; Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*; American Society of Clinical Microbiology; Dec. 1999: 3997-4004.
19. Wang, D., Botkin, D.J. and Norris, S.J.; Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI (2003); Molecular Microbiology; 47(5): 1407-1417.
20. Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999
21. Reiber H., und Lange P. (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain, Clin Chem 37: 1153-60
22. Reiber, H. und Peter J. B. (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, Journal of the Neurological Sciences 184: 101-122.

## Preparación de las muestras de paciente y la solución de lavado

É **Solución de lavado:** Añadir agua destilada/desionizada al concentrado hasta alcanzar 1 litro

É **Dilución del Muestras IgG  
1:101**

p.ej.

10 µl de suero/plasma + 1000 µl de tampón de dilución

(El tampón de dilución para suero está listo para utilizar)

## Realización de la prueba

