

VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)

N.º de encomenda: WE222G32; WE222G96

VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)

N.º de encomenda: WE222M32; WE222M96

VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)

N.º de encomenda: WE223G32; WE223G96

EXCLUSIVAMENTE PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Alemanha

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Utilização | 3 |
| 2. Princípio do teste | 3 |
| 3. Conteúdo da embalagem | 3 |
| 3.1 Kit para 32 determinações | 3 |
| 3.2 Kit para 96 determinações | 3 |
| 4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes | 4 |
| 5. Medidas de precaução e avisos | 4 |
| 6. Material adicionalmente necessário (não fornecido) | 4 |
| 7. Material de análise | 5 |
| 8. Realização do teste | 5 |
| 8.1 Preparação da amostra | 5 |
| 8.2 Preparação dos reagentes | 5 |
| 8.3 Realização do teste Immunoblot | 5 |
| 8.4 Utilização de processores Immunoblot | 6 |
| 9. Avaliação do teste | 6 |
| 9.1 Avaliação das amostras de paciente | 7 |
| 9.2 Utilização do controlo cut off | 7 |
| 9.3 Significado dos antígenos | 7 |
| 9.4 Critérios de avaliação | 9 |
| 9.5 Limites do teste | 11 |
| 10. Literatura | 11 |
| 11. Símbolos | 13 |
| 12. Esquema de realização do teste | 14 |

1. Utilização

Kit de teste Immunoblot LINE destinado à comprovação qualitativa de anticorpos específicos IgG ou IgM contra a *B. burgdorferi* sensu lato no soro humano.

Além de encontrar aplicação no serodiagnóstico da borreliose de Lyme, o immunoblot também é apropriado para a utilização no diagnóstico de líquido da neuroborreliose. Para a utilização no diagnóstico de líquido, por favor, peça as instruções de trabalho separadas.

2. Princípio do teste

Os antígenos do agente infeccioso são transferidos para uma membrana de nitrocelulose através de um processo de pulverização especial. A membrana é, em seguida, cortada em tiras separadas.

A incubação das tiras de nitrocelulose que contêm o antígeno com amostras de soro/plasma humano permite comprovar a existência de anticorpos específicos. Estes anticorpos formam imunocomplexos juntamente com os antígenos fixados na tira de teste. Depois de remover os anticorpos não ligados através de vários passos de lavagem, as várias tiras de nitrocelulose são incubadas com anticorpos IgG ou IgM anti-humanos conjugados à fosfatase alcalina. Depois de remover os anticorpos conjugados não ligados através de mais um passo de lavagem, procede-se à visualização dos complexos antígeno/anticorpo (dos anticorpos ligados), através da adição de um substrato incolor que durante a sua transformação enzimática produz bandas azul/violetas ("bandas de antígeno"). A reação enzima/substrato é parada pela lavagem das tiras de nitrocelulose com água destilada/desionizada. Em função do padrão que se observa na banda, poderá concluir-se para a existência de anticorpos IgG ou IgM específicos.

3. Conteúdo da embalagem

3.1 Kit para 32 determinações

| | | |
|--|----|----------|
| 1. Tiras de teste de IgG ou IgM nitrocelulose com antígenos aplicados, reforçados com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar | 1x | 32 tiras |
| 2. Controlo cut off de IgG ou IgM, soro humano, pré-diluído | 1x | 1.0 ml |
| 3. Tampão de diluição/lavagem, pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante | 2x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG ou IgM (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante | 1x | 0.7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar | 1x | 57 ml |
| 6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados | 1x | 1 unid. |

3.2 Kit para 96 determinações

| | | |
|--|----|----------|
| 1. Tiras de teste de IgG ou IgM nitrocelulose com antígenos aplicados, reforçados com uma película, organizadas numa caderneta, prontas a usar | 3x | 32 tiras |
| 2. Controlo cut off de IgG ou IgM, soro humano, pré-diluído | 2x | 1.0 ml |
| 3. Tampão de diluição/lavagem, pH 7,3 (10x conc.), com tris e conservante | 4x | 50 ml |
| 4. Conjugado IgG ou IgM (100x conc.) anti-humano, fosfatase alcalina (cabra), com conservante | 3x | 0.7 ml |
| 5. Substrato (BCIP/NBT), pronto a usar | 3x | 57 ml |
| 6. Folha de registo e avaliação para registar e arquivar os resultados | 3x | 1 unid. |

A pedido pode ser adquirido adicionalmente:

IgG ou IgM- Controlo positivo, soro humano, pré-diluído, 0,5 ml.

As bandas positivas \geq bandas cut off constam do certificado fornecido.

(N.º de referência: IgG: WE222P60 / WE223P60 ou IgM: WE222P80)

IgG/IgM- Controlo negativo, soro humano, pré-diluído, 0,5 ml.

O controlo negativo não mostra bandas, ou seja, bandas relevantes para a avaliação \geq bandas cut off.

(N.º de referência: IgG/IgM: WE222N10 ou WE223N60)

4. Conservação e prazo de validade do kit de teste e dos reagentes

Guardar o kit de teste a uma temperatura de 2 – 8 °C. O prazo de validade dos vários componentes é indicado na respectiva etiqueta, o prazo de validade do kit consta no certificado de controlo de qualidade.

1. Não congelar os vários reagentes e não expô-los a temperaturas elevadas.
2. Não usar os reagentes se o prazo de validade estiver ultrapassado.
3. Evitar guardar os reagentes num ambiente de luz forte.
4. A solução de substrato BCIP/NBT é sensível à luz e deve ser guardado num local escuro.
5. **Tiras de teste de nitrocelulose:** Usar as tiras imediatamente depois de as ter tirado do saco. Fechar bem novamente o saco com as tiras não usadas e guardá-lo a uma temperatura de 2 – 8 °C. Para arquivar os resultados, é absolutamente necessário guardar as tiras de teste de nitrocelulose protegidas da incidência directa da luz solar, a fim de evitar o desvanecimento das bandas.

| Material | Estado | Armazenamento | Durabilidade |
|--------------------|--------------------------------------|--|--------------|
| Amostras | Não diluído | +2 a +8°C | 1 semana |
| Tiras de teste | Depois de abrir | +2 a +8°C (armazenamento dentro do saco fornecido) | 3 meses |
| Controlos | Depois de abrir | +2 a +8°C | 3 meses |
| Conjugado | Depois de abrir | +2 a +8°C | 3 meses |
| | Diluído | +2 a +8°C | Aprox. 6h |
| Substrato | Depois de abrir | +2 a +8°C (protegido contra a luz) | 3 meses |
| Solução de lavagem | Depois de abrir | +2 a +8°C (protegido contra a luz) | 3 meses |
| | Estado diluído final (pronto a usar) | +2 a +8°C | 4 semanas |
| | Estado diluído final (pronto a usar) | ou temperatura ambiente | 2 semanas |

5. Medidas de precaução e avisos

1. Como soros de controlo são usados apenas soros que foram testados e que se revelaram negativos em relação aos anticorpos de HIV1, HIV2, HIV3 e ao antígeno de superfície de hepatite B. Mesmo assim, os soros de controlo, as amostras, amostras diluídas, os conjugados e as tiras de teste de nitrocelulose devem ser considerados como material potencialmente infeccioso e manuseados com o respectivo cuidado necessário. São aplicáveis as directivas para trabalhos em laboratório.
2. Para a realização do imunoblot devem ser usadas luvas descartáveis e uma pinça de plástico.
3. A eliminação ecológica dos materiais usados deve ser realizada de acordo com as directivas do respectivo país.
4. As tinas de incubação foram concebidas pelo fabricante para o uso único. Uma utilização repetida das tinas de incubação é da responsabilidade do utilizador. Se as tinas de incubação forem usadas várias vezes, recomendamos que depois do seu uso sejam desinfetadas durante várias horas numa solução de hipoclorito de sódio e depois lavadas e passadas exaustivamente por água proveniente da rede de abastecimento e água destilada/desionizada.

6. Material adicionalmente necessário (não fornecido)

1. Tina de incubação (se necessário pode ser adquirida com o n.º de art. WE300.08)
2. Agitador (vertical, não centrifugal)
3. Um frasco de lavagem para parar
4. Pipeta ou dispositivo de lavagem manual
5. Micropipetas 5 µl - 1500 µl
6. Pontas de pipeta
7. Tubos para amostras (tubes) 2 – 20 ml de volume
8. Pinça de plástico
9. Água destilada ou desionizada

10. Papel de filtro

7. Material de análise

Como material de análise podem ser usados soro e plasma (o tipo de anticoagulantes não é relevante), mesmo se neste folheto se refere apenas o soro.

Para a utilização de liquor ver as instruções de utilização separadas do Liquor LINE.

8. Realização do teste

O cumprimento exacto das instruções de trabalho é uma condição essencial para a obtenção de resultados correctos.

8.1 Preparação da amostra

1. Por cada amostra de paciente são necessários 15 µl de soro ou plasma. No **processamento do liquor/soro** deve ser usada por classe Ig apenas a diluição de liquor/soro em separado, calculada individualmente (ver instruções de utilização do Liquor LINE).
2. As amostras de sangue devem ser colhidas de forma asséptica por punção da veia. Após a coagulação completa deve ser separado o soro (não se aplica ao plasma). Para conservar os soros durante mais tempo, estes devem ser congelados a -20°C .
3. Não voltar a congelar e descongelar os soros.
4. Não devem ser usados soros inactivados pelo calor ou lipemica, hemolítica ou microbianamente contaminados porque podem originar resultados errados.
5. Não usar amostras de soro turvas (sobretudo depois da descongelação), eventualmente centrifugar (5 min. a 1.000x g), pipetar o sobrenadante límpido e usar no teste.

8.2 Preparação dos reagentes

1. Para a adaptação à rotina do laboratório, todos os LINEs e EcoBlots podem ser usados no mesmo teste com os mesmos tempos de incubação e componentes com parâmetros e lotes abrangentes. Os controlos cut off são utilizados especificamente para os parâmetros e lotes.
2. Antes de diluir todos os reagentes do teste, o respectivo concentrado deverá ter atingido temperatura ambiente. Usar apenas água destilada/desionizada de qualidade elevada e com temperatura ambiente.
3. Antes da preparação do teste misturar bem os diluentes.
4. **Tampão de diluição/lavagem**
O tampão de diluição/lavagem existe numa concentração de 10 vezes. Diluir o concentrado de diluição/lavagem 1:10:00 com água destilada ou desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml de água destilada/desionizada), misturar bem.
Tanto o tampão de diluição/lavagem concentrado como o diluído podem apresentar, eventualmente, uma coloração amarela. Esta coloração amarela não tem influência sobre o prazo de validade do tampão de diluição/lavagem nem sobre a funcionalidade ou capacidade de expressão diagnóstica do teste.
5. **Conjugado de IgG ou IgM**
Diluir o conjugado 1 + 100 com tampão de diluição/lavagem no estado diluído final e misturar bem. Por cada amostra de soro são necessários 1,5 ml de solução de conjugado. Ver tabela de diluição do conjugado (ponto: "Esquema de realização do teste").
6. **Substrato**
O substrato é fornecido pronto a usar.

8.3 Realização do teste Immunoblot

Atenção: As tiras de teste de nitrocelulose podem ser testadas apenas na respectiva classe Ig autorizada (ver etiqueta na caderneta de blot e a designação que consta nas várias tiras de teste).

Para a realização e avaliação correcta do Borrelia in vivo LINE deverá ser realizado em cada teste também um controlo cut off específico para cada parâmetro e cada lote.

Para um diagnóstico seguro da borrelia, o LINE deve ser realizado no IgG e no IgM.

1. O teste é realizado à temperatura ambiente.
2. Por cada amostra colocar 1 tira no sulco de uma tina de incubação limpa. Pegar as tiras apenas na ponta marcada superior.
3. Pipetar sempre 1,5 ml de **tampão de diluição/lavagem** pronto a usar e colocar sobre o agitador. Verificar se a tira de teste de nitrocelulose está uniformemente coberta de líquido, pois enquanto se realiza o teste as tiras não podem secar.
4. As tiras de teste de nitrocelulose reforçadas são humedecidas totalmente dentro de um minuto e podem ser incubadas deitadas de costas, de barriga ou de lado.
5. Adicionar com a pipeta sempre **15µl de soro/plasma de paciente** ou **100µl do controlo cut off / positivo / negativo**, se possível no extremo superior marcado da tira. Incubar o soro de paciente e o controlo durante **30 minutos** no agitador. Ao pipetar e durante a seguinte remoção do líquido, estar com atenção para que não haja contaminações cruzadas das várias amostras de paciente.
6. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitar o líquido fora com muito cuidado. Ao deitar o líquido fora as tiras de teste de nitrocelulose ficam agarradas ao fundo dos sulcos. Secar o líquido restante com um papel absorvente.
7. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. Antes de proceder ao último passo de lavagem preparar a quantidade necessária de diluente de conjugado fresco (ver tabela).
8. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6)..
9. Pipetar sempre 1,5 ml do **diluyente de conjugado** obtido para os respectivos sulcos de incubação e incubar durante **30 minutos** no agitador.
10. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora.
11. **Lavar** as tiras: Incubar sempre com 1,5 ml de tampão de diluição/lavagem pronto a usar durante **3 x 5 minutos** no agitador. Aspirar o tampão de lavagem sempre por completo ou deitá-lo fora. A seguir, lavar durante **1 x 1 minuto** com **água destilada/desionizada**.
12. Aspirar totalmente o líquido dos sulcos ou deitá-lo fora (ver ponto 6)..
13. Pipetar 1,5 ml da **solução de substrato** pronta a usar em cada sulco e revelar durante **10 ± 3 minutos** no agitador.
14. **Parar** a revelação da cor através da remoção do substrato. A seguir, lavar as tiras **3 x** com 1,5 ml de **água destilada/desionizada**, sem incubação intermédia.
15. Deitar a água destilada/desionizada fora e secar as tiras sobre um papel absorvente limpo. A coloração de fundo, observada em tiras de teste de nitrocelulose húmidas, desaparece totalmente quando as tiras estão secas. Em comparação com as tiras de teste de nitrocelulose habituais, as tiras de teste de nitrocelulose reforçadas levam mais tempo a secar.
16. Para a avaliação usar o registo de avaliação e a máscara específica do kit que acompanham a embalagem. A escrita nas bandas altamente específicas na folha de registo facilita a avaliação das amostras de paciente.

Esquema do teste ver última página

8.4 Utilização de processores Immunoblot

Para o processamento automatizado dos Blots e LINES estão validados os seguintes aparelhos: Apollo e Profiblot. Basicamente, são adequados todos os blots automáticos habituais.

9. Avaliação do teste

Para uma avaliação segura, cada tira de LINE proporciona dois controlos:

1. **Controlo do soro** (= serum control):
A banda de incubação do soro aparece apenas depois da incubação com soro de paciente, aparecendo por baixo da linha de marcação (=markline).
2. **Controlo do conjugado** (= conjugate control):
A tira LINE está equipada com uma banda de controlo do conjugado que se torna visível depois da incubação com o respectivo conjugado.

O teste é válido se na tira de teste de nitrocelulose revelada estiver bem visível tanto o controlo de soro como também o controlo de conjugado interno.

A posição das bandas de soro e das bandas de controlo do conjugado consta na folha de registo.

9.1 Avaliação das amostras de paciente

A posição e a designação das bandas reactivas consta na folha de registo.

Bandas IgM: OspC, VisE-Mix, p39 e uma banda EBV para o diagnóstico de exclusão

Bandas IgG: VisE-Mix, p39, p83/100, (iv1), (iv2), (iv3), (iv4) e banda TpN17 para diagnóstico de exclusão (apenas com WE 223G)

9.2 Utilização do controlo cut off

As bandas cuja intensidade é mais fraca que as bandas cut off do controlo cut off não são utilizadas para a avaliação.

Bandas cut off IgM: OspC

Bandas cut off IgG: VisE-Mix

9.3 Significado dos antígenos

Lista dos antígenos de *Borrelia burgdorferi* utilizados, altamente purificados (OspC) e recombinantes (VisE, p83/100, p39, BBA36, BBO323, Crasp3 und pG), o EBV Viral Capsid Antigen gp125 e o antígeno TpN17. A mistura de VisE é constituída por dois antígenos recombinantes da genoespécie *Borrelia burgdorferi* s. s. e *Borrelia garinii*.

| Antígeno/ Denominação | Significado dos antígenos | Especificidade dos anticorpos em LINE | Estirpes de origem/purificaçã o |
|---|---|---|---|
| OspC (p23), antígeno nativo purificado | Outer surface-protein C. Lipoproteína codificada pelo plasmídeo (6, 22, 26, 28). Marcador importante para manifestações precoces de borreliose de Lyme na sorologia de IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). <u>Relevância biológica:</u> <i>B. burgdorferi</i> s. l. necessita de OspC provavelmente para uma infeção inicial bem-sucedida do mamífero hospedeiro (46, 47, 48, 49). As espiroquetas expressam OspC durante a refeição de sangue na carraça e na fase inicial de infeção do mamífero hospedeiro (46). Após a transmissão das espiroquetas para o mamífero, a expressão OspC é novamente regulada para baixo. A lipoproteína não parece ser necessária para uma infeção persistente (47, 47). Tilly et al. suspeitam que a OspC impede a fagocitose das espiroquetas durante a fase inicial da infeção do mamífero hospedeiro (50). | Específico (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32) | <i>B. afzelii</i> PKo (originalmente isolada de lesão de eritema migratório na Alemanha) / purificada mediante SDS-Page preparativo |
| VisE, recombinante | Variable major protein like sequence E. Lipoproteína <i>B. burgdorferi</i> experimentada <i>in vivo</i> , que apresenta epítomos conservados – de várias genoespécies – altamente imunogénicos. Na sorologia de IgM são observadas reatividades contra VisE, especialmente no caso de soros de doentes com borreliose de Lyme precoce. Na sorologia de IgG são observadas reatividades contra VisE, especialmente no caso de soros de doentes com borreliose de Lyme precoce e avançada. VisE funciona na sorologia de IgG como marcador de borreliose de Lyme nos vários estádios da doença. VisE é um antígeno de 35 kDa, que está codificado na lp28-1 (2). <u>Relevância biológica:</u> <i>B. burgdorferi</i> s.l. pode persistir em mamíferos infetados, apesar da sua resposta imunológica ativa. Suspeita-se que a diversidade combinatória dos antígenos da proteína de superfície VisE contribui - como mecanismo de "immune escape" - para esta persistência (51, 52, 53). | Específico | <i>B. burgdorferi</i> B31 (originalmente isolada de uma carraça infetada de Shelter Island, Nova Iorque), <i>B. garinii</i> IP90 (originalmente isolada de uma carraça na Rússia) / Purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |

| | | | |
|--|--|--|--|
| p39 (BmpA), recombinante | Borrelial membrane protein A. Marcador central codificado cromossomicamente (6, 19), na sorologia de IgG para infeções de borreliose de Lyme disseminadas (4, 8, 18). As proteínas Bmp são lipoproteínas com função desconhecida. | Altamente específico (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32) | <i>B. afzelii</i> PKo (originalmente isolada de lesão humana de eritema migratório na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| p83/100, recombinante | Antigénio codificado cromossomicamente, associado ao cilindro protoplasmático (12, 13), conservado em <i>B. burgdorferi</i> s. l. (17). Marcador central na sorologia de IgG para borreliose de Lyme avançada (8, 24, 29). | Altamente específico (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31) | <i>B. afzelii</i> PKo (originalmente isolada de lesão humana de eritema migratório na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| BBA36 (iv1)*, recombinante | Antigénio <i>B. burgdorferi</i> de 22 kDa experimentado <i>in vivo</i> , que está codificado na lp54. BBA36 apresenta epítomos conservados - de várias genoespécies - altamente imunogénicos. BBA36 é um marcador importante para borreliose de Lyme avançada (infeções disseminadas) na sorologia de IgG (10). | Altamente específico | <i>B. afzelii</i> MMS (originalmente isolada de uma carraça infetada na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| BBO323 (iv2)*, recombinante | Antigénio <i>B. burgdorferi</i> de 42 kDa experimentado <i>in vivo</i> , que está codificado cromossomicamente. BBO323 apresenta epítomos conservados - de várias genoespécies - altamente imunogénicos. BBO323 é um marcador importante para borreliose de Lyme avançada (infeções disseminadas) na sorologia de IgG. (54) | Específico | <i>B. burgdorferi</i> ZS7 (originalmente isolada de uma carraça infetada na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| Crasp3 (iv3)*, recombinante | Complement regulator-acquiring surface protein3. Antigénio de superfície <i>B. burgdorferi</i> de 21 kDa experimentado <i>in vivo</i> , que está codificado na cp32-8. Membro da família Erp. Marcador importante para borreliose de Lyme avançada (infeções disseminadas) na sorologia de IgG. Crasp3 auxilia a resistência ao complemento (11, 54). | Altamente específico | <i>B. burgdorferi</i> ZS7 (originalmente isolada de uma carraça infetada na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| pG (iv4)*, recombinante | Antigénio <i>B. burgdorferi</i> de 22 kDa experimentado <i>in vivo</i> , que está codificado na cp32-3. Membro da família Erp. Marcador importante para borreliose de Lyme avançada (infeções disseminadas) na sorologia de IgG (16). | Altamente específico | <i>B. burgdorferi</i> ZS7 / <i>B. afzelii</i> (originalmente isolada de uma |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | | carraça infetada na Alemanha) / purificada de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |
| EBV VCA-gp125 | “Virus Capsid Antigen” imunodominante de Epstein Barr. Os anticorpo de IgM contra o VCA-gp125 desaparecem normalmente algumas semanas após a infeção pelo VEB. | Marcador altamente específico na sorologia de IgM para uma infeção primária pelo VEB | A purificação de gp125 resulta do lisado de células inteiras (células humanas infetadas por VEB) mediante cromatografia de afinidade utilizando um anticorpo anti-gp125 monoclonal |
| <i>Treponema pallidum</i> TpN17 recombinante (apenas em WE223G) | Marcador de sífilis primária, secundária e latente | altamente específico para todos os estádios de infeção | <i>Treponema pallidum</i> / Purificado de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA |

*(iv1-4) = in vivo (iv) antígenos expressos

9.4 Critérios de avaliação

A interpretação dos resultados sorológicos deve incluir sempre o quadro clínico, dados epidemiológicos e outros resultados analíticos disponíveis.

Avaliação global recomendada (IgM + IgG) dos antígenos de borrelia

Para um diagnóstico seguro de borrelia, o LINE deve ser realizado no IgG e no IgM e diagnosticado em comum.

São consideradas positivas apenas as bandas que mostram uma intensidade \geq à das bandas de cut off.

| Banda(s) a aparecer no IgM | | Banda(s) a aparecer no IgG | Avaliação |
|--|-----------|---|---------------------|
| Sem bandas ou < bandas de cut off | ou | Sem bandas ou < bandas de cut off ou 1 1 banda IgG (excepto VIsE) | Negativo |
| 1 banda IgM (excepto OspC) | ou | Bandas IgG VIsE | no limite |
| Banda IgM OspC ou ≥ 2 bandas IgM | ou | ≥ 2 bandas IgG | Positivo |
| 1 banda IgM | e | 1 banda IgG | Positivo (*) |

(*) A constelação de bandas na linha sobre um fundo cinzento mostra a combinação de apenas uma banda no IgM mais uma banda no IgG que na avaliação global (IgM + IgG) deve ser considerada positiva.

Avaliação recomendada com EBV-gp125 positivo na serologia IgM

No âmbito de uma infecção primária pelo EBV podem surgir reactividades de anticorpos contra os antígenos de *Borrelia burgdorferi* sensu-lato, devido à estimulação policlonal das células B (55). Daí poderá resultar um diagnóstico da borreliose de Lyme erradamente positivo. Para minimizar tais diagnósticos errados, o VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE Immunoblot contém o **Viral Capsid Antigen gp125** Epstein Barr. Se, na serologia IgM e/ou IgG, os gp125 reagirem igualmente com uma intensidade \geq da banda cut off IgM, a par dos antígenos de *Borrellia*, deve verificar-se o estado completo EBV do soro a título de segurança (por ex. com o VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; enc. nº: WE102G32/96 e VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot; enc. nº: WE102M32/96).

A banda **EBV-gp125** não está validada para uma aplicação no diagnóstico de líquido.

Avaliação recomendada da banda TpN17

A banda do antígeno TpN17 para *Treponema pallidum* (apenas para WE223G)

No diagnóstico serológico da borreliose de Lyme observam-se reacções cruzadas com outros microorganismos. Neste contexto, as infecções com o vírus de herpes (sobretudo EBV), bem como com doenças causadas por bactérias, tal como a sífilis, revestem-se aqui de grande importância. A MiQ12/2000 para borreliose de Lyme recomenda: “Em caso de resultados de teste difusos ou positivos (observação: da serologia da borreliose de Lyme), deve realizar-se um teste Lues (por ex. TPHA), para excluir resultados erradamente positivos devido a anticorpos com reacção cruzada contra os treponemas.”

A banda TpN17 destina-se a detectar resultados erradamente difusos/positivos no diagnóstico serológico da borreliose de Lyme por anticorpos que apresentam reacção cruzada devido a uma infecção com *Treponema pallidum* (sífilis).

Se, no VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot, haver uma reacção banda TpN17 \geq banda cut off IgG e, simultaneamente, uma reacção de antígenos da borrelia no IgM e/ou no IgG, deve verificar-se, a título de segurança, o estado completo do soro quanto à sífilis (por ex. com VIROTECH *Treponema pallidum* IgG LINE Immunoblot, enc. nº: WE150G16/32 e VIROTECH *Treponema pallidum* IgG LINE Immunoblot, enc. nº: WE150M16/32).

Deve respeitar-se impreterivelmente o seguinte:

- A banda TpN-17 não pode substituir um diagnóstico diferencial completo da sífilis em termos de sensibilidade e especificidade.
- Uma banda de antígenos TpN17 negativa não exclui, de um modo geral, a possibilidade de existência de anticorpos contra *Treponema pallidum*.
- Um resultado positivo da banda de antígenos TpN17 deve ser averiguado por testes adequados de confirmação de *Treponema pallidum* (por ex.: VIROTECH WE150).
- A banda TpN-17 não está validada para uma aplicação no diagnóstico de líquido.

Constelações de diagnóstico típicos

A ordem dos antígenos nas tiras do *Borrelia* in vivo LINE foi escolhida por forma a que os antígenos (por exemplo: OspC, VIsE-IgM, VIsE-IgG) que reagem preferencialmente com anticorpos de pacientes com borrelioses de Lyme antigas se encontram na parte superior da tira (próximos da linha de marcação). Os antígenos (por exemplo: p83, BBA36, BBO323, Crasp3, pG) que reagem preferencialmente com anticorpos de pacientes com borrelioses de Lyme avançadas encontram-se na parte inferior da tira (afastados da linha de marcação). Desta forma, já a impressão óptica da distribuição nas bandas constitui um indício para o estado da infecção (desde a borreliose de Lyme antiga à tardia).

Exemplos para constelações de bandas frequentes nos seguintes estados de infecção:

| Fase da borreliose | Serologia IgM | Serologia IgG |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|
| Borrelioses de Lyme precoces | OspC | VIsE |
| | VIsE | VIsE |
| | p39 | VIsE |
| | ≥ 2 bandas | nenhuma ou VIsE |

| | | |
|---|---|---|
| | OspC | nenhuma |
| Borrelioses de Lyme disseminadas | Podem aparecer todas as bandas IgM ou nenhuma | VlsE e p39 |
| | | 2 bandas |
| Borrelioses de Lyme avançadas | As bandas IgM são cada vez menos nítidas. | Com o avanço da infecção aparecem, normalmente, também cada vez mais bandas IgG nas mais variadas combinações. p39, p83, VlsE, iv1-4 (BBA36, BBO323, Crasp3 e pG) |

9.5 Limites do teste

- Um resultado negativo no soro não exclui completamente uma possível infecção com *B. burgdorferi* s.l. A amostra pode ter sido recolhida antes do surgimento dos anticorpos, ou a titulação de anticorpos situa-se abaixo do limite comprovativo do teste.
- O tratamento dos pacientes com antibiótica no estado precoce da doença (35, 37) pode provocar a supressão da resposta imunológica, por forma a ser impossível comprovar anticorpos anti-*B. burgdorferi* específicos.
- A reacção cruzada entre *Borrelia* e outros espiroquetídios pode provocar o aparecimento de bandas associadas a borrelias e, por conseguinte, um resultado positivo errado. Os soros de pacientes com as seguintes infecções (exemplos) podem apresentar reacções cruzadas: Sífilis (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenuae*), febre recorrente (*Borrelia* espec.), leptospiroses (leptoespiros espec.) (38). Também o vírus do herpes (CMV, HSV, parvovírus) pode provocar reacções cruzadas (34, 39). Se, para além de reactividades contra os antígenos da borreliose de Lyme, se apresentar uma reactividade contra o antígeno TpN17 no VIROTECH *Borrelia* in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE223G), devem tomar-se em consideração as indicações no ponto 9.4 (Avaliação recomendada da banda TpN17).
- No âmbito de uma infecção primária pelo EBV podem surgir reactividades de anticorpos contra os antígenos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato, devido à estimulação policlonal das células B (34, 39). Se, para além de reactividades IgM e/ou IgG contra os antígenos da borreliose, se apresentar, também uma reactividade contra EBV-gp125 no VIROTECH *Borrelia* in vivo IgM LINE, deve excluir-se uma mononucleose através de meios de diagnóstico diferencial.
- Em casos isolados, os soros de paciente podem mostrar bandas "inversas" (fundo escuro, bandas brancas); estas não devem ser consideradas, o que significa que, neste caso, o Immunoblot não pode ser avaliado. O soro deverá ser analisado através de outros métodos serológicos.

10. Literatura

- Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
- Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
- Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
- Dressler et al., 1993 Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease J. infect Dis. 176:392-400
- Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
- Fawcett et al., 1993 Detection of antibodies to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. J. Rheumatol. 20:734-738
- Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
- 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
- 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
- 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. Moskophidis 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. Bakteriol. 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 Borrelieninfektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78: 934-39
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88

39. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, *Infection* 27 No.3: 231
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, *Science* 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, *N. Engl. J. Med.* 321:586-96.
42. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljić, 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.* 2008; 298(3-4): 279-90
43. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczky, 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.* 75(10): 4817-25
44. 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
45. Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten –Teil44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.
46. 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
47. 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
48. 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
49. 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
50. 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
51. 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.* 65(6): 1547-58
52. 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
53. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. *Mol Microbiol* 60: 1319-1322
54. Nowalk et al. (2006), Serologic Proteome Analysis of *Borrelia burgdorferi* Membrane-Associated Proteins, *Infection and Immunity* 74, No.7: 3864-3873
55. Poggensee, G. et al (2008), Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze, *Bundesgesundheitsblatt* 50: 1329-1339

11. Símbolos



Ver instruções de utilização!

12. Esquema de realização do teste

Realização do teste numa forma sucinta:

| | | |
|------------------------|---------------------------------------|--|
| Incubação de amostras | 30 minutos | 15 µl de soro/plasma de paciente /100 µl de controlo cada um em 1,5 ml de diluição/lavagem |
| Lavar | 3 x 5 minutos | Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem |
| Incubação do conjugado | 30 minutos | Com 1,5 ml de conjugado diluído (1 + 100) |
| Lavar | 3 x 5 minutos 1 x 1 minuto | Com 1,5 ml tampão de diluição/lavagem Com água destilada/desionizada |
| Incubação do substrato | 10 ± 3 minutos | Com 1,5 ml de substrato |
| Parar | 3 x sem incubação intermédia | Com 1,5 ml de água destilada/desionizada |

Tabela de diluição do conjugado: (arredondado)

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Número de tiras | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Tampão de diluição/lavagem | 1,5ml | 3,0ml | 4,5ml | 6,0ml | 7,5ml | 9,0ml | 11,0ml | 12,0ml | 14,0ml | 15,0ml |
| Concentrado de conjugado | 15µl | 30µl | 45µl | 60µl | 75µl | 90µl | 110µl | 120µl | 140µl | 150µl |
| Volume final | 1,515ml | 3,03ml | 4,545ml | 6,06ml | 7,575ml | 9,09ml | 11,11ml | 12,12ml | 14,14ml | 15,15ml |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Número de tiras | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Tampão de diluição/lavagem | 17,0ml | 18,0ml | 20,0ml | 21,0ml | 23,0ml | 24,0ml | 26,0ml | 27,0ml | 29,0ml | 30,0ml |
| Concentrado de conjugado | 170µl | 180µl | 200µl | 210µl | 230µl | 240µl | 260µl | 270µl | 290µl | 300µl |
| Volume final | 17,17ml | 18,18ml | 20,2ml | 21,21ml | 23,23ml | 24,24ml | 26,26ml | 27,27ml | 29,29ml | 30,3ml |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Número de tiras | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| Tampão de diluição/lavagem | 32,0ml | 33,0ml | 35,0ml | 36,0ml | 38,0ml | 39,0ml | 41,0ml | 42,0ml | 44,0ml | 45,0ml |
| Concentrado de conjugado | 320µl | 330µl | 350µl | 360µl | 380µl | 390µl | 410µl | 420µl | 440µl | 450µl |
| Volume final | 32,32ml | 33,33ml | 35,35ml | 36,36ml | 38,38ml | 39,39ml | 41,41ml | 42,42ml | 44,44ml | 45,45ml |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Número de tiras | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| Tampão de diluição/lavagem | 47,0ml | 48,0ml | 50,0ml | 51,0ml | 53,0ml | 54,0ml | 56,0ml | 57,0ml | 59,0ml | 60,0ml |
| Concentrado de conjugado | 470µl | 480µl | 500µl | 510µl | 530µl | 540µl | 560µl | 570µl | 590µl | 600µl |
| Volume final | 47,47ml | 48,48ml | 50,5ml | 51,51ml | 53,53ml | 54,54ml | 56,56ml | 57,57ml | 59,59ml | 60,6ml |