

VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot

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

N.º de encomenda: WE224G32; WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

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

N.º de encomenda: WE224M32; WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

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

N.º de encomenda: WE225G32; WE225G96

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).....	5
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.....	6
8.4 Utilização de processores Immunoblot	7
9. Avaliação do teste.....	7
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. Esquema de realização do teste	15

1. Utilização

Kit de teste Immunoblot LINE destinado à comprovação qualitativa de anticorpos específicos IgG ou IgM contra a *Borrelia (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

As proteínas do antígeno do agente infeccioso transferem-se para uma membrana de nitrocelulose mediante uma técnica especial de pulverização. 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:

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

IgG ou. IgM	controles prontos a usar	Abreviatura
1,0 ml IgG, ou 1,0 ml IgM	neg. ctrl. / controlo negativo, soro humano/plasma com estabilizadores de proteínas e conservante, pronto a usar	NEG
1,0 ml IgG, b ou 1,0 ml IgM	Ctrl. / Cut off control, soro humano/plasma com estabilizadores de proteínas e conservante, pronto a usar	CO
1,0 ml IgG, ou 1,0 ml IgM	pos. Ctrl. / controlo positivo, soro humano/plasma com estabilizadores de proteínas e conservante, pronto a usar	POS

Bandas positivas > Banda cortada podem ser encontradas no certificado fornecido.

O controlo negativo não mostra nenhuma banda ou nenhuma banda relevante para a avaliação > Banda cortada.

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 desinfectadas 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 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 LINE Borrelia Europe deverá ser realizado em cada teste também um controlo cut off específico para cada parâmetro e cada lote.

Para um diagnóstico seguro da borrelia Europe, 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 **diluente 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

Para a posição e designação das bandas reactivas, consulte a folha de registo.

Bandas IgM: OspC, VlsE-Mix, p39 BmpA, DbpA-Mix e uma banda EBV para diagnóstico de exclusão

Bandas IgG: OspC, VlsE-Mix, p39 BmpA, DbpA-Mix ou DbpA-PKo, p58, p83 e banda TpN17 para diagnóstico de exclusão (apenas para WE 225G)

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: VlsE-Mix

9.3 Significado dos antígenos

Lista dos antígenos utilizados *Borrelia burgdorferi*, altamente purificados e recombinantes, o **antígeno BV-Viral Capsid gp125** e o **antígeno TpN 17**. O VlsE-Mix é composto por dois antígenos recombinantes da geno-espécie *Borrelia burgdorferi* no sentido restrito e *Borrelia garinii*. O DbpA-Mix é composto pelas geno-espécies recombinantes *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii* e o *Borrelia afzelii* altamente purificado.

Antígeno/ Denominação	Significado dos antígenos	Especificidade dos anticorpos em LINE	Estirpes de origem/purificação
OspC (p23) altamente purificada	Outer surface protein C. Lipoproteína codificada pelo plasmídeo (6, 22, 26, 28). Marcador importante para manifestações precoces de borreliose de Lyme, especialmente 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 (48, 63, 70, 71). As espiroquetas expressam OspC durante a refeição de sangue na carraça e na fase inicial de infeção do mamífero hospedeiro (48). 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 (48, 63). Tilly et al. suspeitam que a OspC impede a fagocitose das espiroquetas durante a	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

	fase inicial da infecção do mamífero hospedeiro (64).		
VlsE recombinante	Variable major protein like sequence E. Lipoproteína experimentada <i>in vivo</i>, que apresenta epítomos conservados – de várias genoespécies – altamente imunogênicos. Na sorologia de IgM são observadas reatividades contra VlsE, especialmente no caso de soros de doentes com borreliose de Lyme precoce. Na sorologia de IgG são observadas reatividades contra VlsE, especialmente no caso de soros de doentes com borreliose de Lyme precoce e avançada. VlsE funciona na sorologia de IgG como marcador de borreliose de Lyme nos vários estádios da doença. VlsE 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 infectados, apesar da sua resposta imunológica ativa. Suspeita-se que a diversidade combinatória dos antígenos da proteína de superfície VlsE contribui - como mecanismo de „immune escape“ - para esta persistência (42, 44, 56).	Específico	<i>B. burgdorferi</i> B31 (originalmente isolada de uma carraça infectada de Shelter Island, Nova Iorque), <i>B. garinii</i> IP90 (originalmente isolada de uma carraça na Rússia) / Purificado 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 infecções de borreliose de Lyme disseminadas (4, 8, 18). As proteínas Bmp são lipoproteínas com função desconhecida (43, 57, 62).	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
DbpA altamente purificada (DbpA Pko)/ recombinante (DbpA PBi, PBr, A14 S)	Decorin binding protein A (também Outer surface protein 17 ou p17). Lipoproteína codificada por plasmídeos. As DbpAs de vários isolados das espécies de agentes patogênicos humanos <i>B. burgdorferi</i>, <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. bavariensis</i> e <i>B. spielmanii</i> foram descritas como antígenos sensíveis e específicos - que se complementam mutuamente na sua reatividade (47, 60, 61, 69). São marcadores da sorologia de IgM e IgG, especialmente para neuroborreliose e artrite de Lyme (50, 52, 57, 58, 59, 60). <u>Relevância biológica:</u> A adesão microbiana no tecido do hospedeiro representa um passo precoce e crítico na patogênese da maioria das doenças infecciosas. As várias espécies de borrelias expressam duas adesinas de ligação à decorina expressas	Altamente específico	<i>B. bavariensis</i> PBi e <i>B. garinii</i> PBr (originalmente isoladas do líquido cefalorraquidiano de um doente com neuroborreliose na Alemanha), <i>B. spielmanii</i> A14S (originalmente isolado de uma lesão de eritema migratório nos Países Baixos)/ purificadas de <i>E. coli</i> mediante cromatografia de afinidade em Ni-NTA <i>B. afzelii</i> PKo (originalmente isolada de lesão de eritema migratório na Alemanha) / purificada

	na superfície, DbpA e B, que transmitem a ligação das espiroquetas à matriz extracelular do hospedeiro. As borrelias existentes na saliva da carraça penetram na derme, ligando-se às fibras de colagénio, ou seja, através das adesinas A e B de ligação à decorina para a decorina dos proteoglicanos associada ao colagénio (46, 49, 72).		mediante SDS-Page preparativo
p58 (OppA-2) recombinante	Oligopeptide permease protein A-2 (OppA-2). Lipoproteína codificada cromossomicamente, que é conservada entre as espécies (54). Marcador importante na sorologia de IgG para borreliose de Lyme avançada (47, 51, 57, 67, 68). <u>Relevância biológica:</u> OppA é um transportador da membrana, que tem, possivelmente, um papel na adaptação de <i>B. burgdorferi</i> s. l. ao ambiente do hospedeiro (55, 66).	Altamente específico	<i>B. bavariensis</i> PBI (originalmente isolada do líquido cefalorraquidiano de um doente com neuroborreliose 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> sensu lato (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
EBV VCA-gp125 purificado por afinidade	“Virus Capsid Antigen” imunodominante de Epstein Barr. Os anticorpos 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 pg125 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 WE225G)	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

9.4 Critérios de avaliação

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

Só são avaliadas como positivas as bandas que mostram uma intensidade $\geq$ da banda de cut off.

Avaliação recomendada de IgM¹

Banda(s) que ocorre(m)	Avaliação
Ocorrência de ≥ 2 bandas dos seguintes: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix ou OspC isolado (p23)	Positivo
Só uma banda de: p39 BmpA, DbpA-Mix, VlsE-Mix	Difuso
Nenhuma das seguintes bandas ≥ banda cut off: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	Negativo

Avaliação recomendada de IgG¹

Banda(s) que ocorre(m)	Avaliação
Ocorrência de ≥ 2 bandas dos seguintes: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/ou DbpA-PKo, VlsE-Mix	Positivo
Só uma banda de: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/ou DbpA-PKo, VlsE-Mix	Difuso
Nenhuma das seguintes bandas ≥ banda cut off: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix e/ou DbpA-PKo, VlsE-Mix	Negativo

* Ambas as bandas DbpA (Mix e PKo) são avaliadas no IgG em comum como 1 banda

Avaliação recomendada em caso de VCA-gp125 positivo na serologia IgM

No âmbito de uma infecção EBV primária, com base na estimulação celular B policlonal, é possível ocorrerem actividades de anticorpos contra o antígeno no sentido lato *Borrelia burgdorferi*. Daqui pode resultar um resultado erradamente positivo de borreliose de Lyme. Com vista a minimizar diagnósticos errados deste tipo, o VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot contém o antígeno Barr Viral Capsid gp125. Se além do gp125 também reagirem simultaneamente antígenos de borreliose (no IgM e/ou IgG) com uma intensidade ≥ da banda cut-off IgM, para segurança deve ser verificado o estado EBV completo do soro (p.ex. com o VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; enc. n.º : IgG: WE102G32/96 e VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot: WE102M32/96).

Avaliação recomendada da banda TpN17

A banda do antígeno TpN17 para *Treponema pallidum* (apenas para WE225G)

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

¹ nach MIQ 12/2000 und DIN 58969-44 Juli 2005 [7,73]

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 Europe + 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 e VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot WE150).

Deve respeitar-se imprerivelmente o seguinte:

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

9.5 Limites do teste

1. Um resultado negativo no soro não exclui completamente uma possível infecção com *Borrelia 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.
2. 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.
3. A reacção cruzada entre a *borrelia* e outros espiroquetas pode originar a ocorrência de bandas associadas à borreliose, podendo ter como consequência um resultado erradamente positivo. Soros de pacientes com, p.ex., as seguintes infecções podem reagir de modo cruzado: sífilis (*Treponema pallidum*), framboesia (*Treponema pertenue*), febre recorrente (*Borrelia spez.*), leptospirose (*Leptospiren spez.*) (38). Também podem ocorrer reacções cruzadas em vírus herpes (HSV, CMV) e parvovirus (34, 39). No caso da VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE225G), se além de reactividades contra o antígeno de borreliose de Lyme também se verificar uma reactividade contra o antígeno TpN17, devem tomar-se em consideração as indicações referidas no ponto 9.4 (avaliação recomendada da banda TpN17).
4. No âmbito de uma infecção EBV primária, com base na estimulação celular B policlonal, é possível ocorrer actividades de anticorpos contra o antígeno no sentido lato *Borrelia burgdorferi* (34, 39). Se na VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot para além de reactividades contra o antígeno da borreliose (IgM e/ou IgG) se revele também uma reactividade contra o EBV-gp125, uma mononucleose deve excluir-se uma mononucleose através de meios de diagnóstico diferencial.
5. 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

1. Agüero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease J. infect Dis. 176:392-400

5. Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Detection of antibodies to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. J. Rheumatol. 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Interpretation criteria for Standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*. Med. Microbiol. Immunol. 185:121-129
10. Wallich, R. et al.; Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease; Eur. J. Immunol. 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family; Eur. J. Immunol. 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. Clin. Microbiol. 28:1673-1676
13. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immunodominant protoplasmic cylinder antigen. Infect. Immun. 60:4309-4321
14. Ma et al., 1992 Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30:370-376
15. Moskopidis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. Lab. Med. 19:231-237
16. Wallich, R. et al.; Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo; Infection and Immunity 1995 Sept:3327-3335
17. Roessler et al., 1995 Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
18. Roessler et al., 1997 Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies variability on Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
19. Simpson et al., 1990 reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
20. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
21. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95
22. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. 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 *Borrellien*. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182

33. Oschmann und Kraiczy, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis*, UNI-MED-Verlag
34. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelien infektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78: 934-39
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88
39. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
42. Bankhead, T., Chaconas, G. (2007) The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. Mol Microbiol
43. Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Carbonaro, C.A., Wormser, G.P., Aguero-Rosenfeld, M.E., Cabello, F.C. (2005) *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 12: 935-940
44. Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B. (2006) Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. J Bacteriol 188: 4879-4889
45. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B. (2007) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Med Microbiol
46. Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., Leong, J.M. (2003) Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 7307-7312
47. Göttner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 43: 3602-3609
48. Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3142-3147
49. Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Hook, M. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 30: 711-723
50. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1998) Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Clin Diagn Lab Immunol 5: 456-462
51. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1999) Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 37: 2241-2247
52. Heikkilä, T., Seppälä, I., Saxen, H., Panelius, J., Yrjänäinen, H., Lahdenne, P. (2002) Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. J Clin Microbiol 40: 453-460
53. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, P. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resist complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and FHL-1. Infect Immun
54. Kornacki, J.A., Oliver, D.B. (1998) Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. Infect Immun 66: 4115-4122

55. Medrano, M.S., Ding, Y., Wang, X.G., Lu, P., Coburn, J., Hu, L.T. (2007) Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 189: 2653-2659
56. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the *Borrelia* story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
57. Nowalk, A.J., Gilmore, R.D., Jr., Carroll, J.A. (2006) Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. Infect Immun 74: 3864-3873
58. Panelius, J., Lahdenne, P., Saxen, H., Carlsson, S.A., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Lauhio, A., Seppala, I. (2003) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR6 peptide. J Neurol 250: 1318-1327
59. Panelius, J., Sillanpää, H., Seppala, I., Sarvas, H., Lahdenne, P. (2007) Antibodies to recombinant decorin-binding proteins A and B in the cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis. Scand J Infect Dis 39: 775-780
60. Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J., Wilske, B. (2003) Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. J Clin Microbiol 41: 1299-1303
61. Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., Goettner, G., Rogge, S., Wilske, B. (2006) Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the dbpA gene. Int J Med Microbiol 296 Suppl 40: 250-266
62. Shin, J.J., Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Cabello, F.C. (2004) Localization of BmpA on the exposed outer membrane of *Borrelia burgdorferi* by monospecific anti-recombinant BmpA rabbit antibodies. Infect Immun 72: 2280-2287
63. Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. Infect Immun 74: 3554-3564
64. Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. Infect Immun 75: 1517-1519
65. Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J. (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 37: 3025-3028
66. Wang, X.G., Kidder, J.M., Scagliotti, J.P., Klempner, M.S., Noring, R., Hu, L.T. (2004) Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (Opp) operon. J Bacteriol 186: 51-60
67. Wilske, B., Hauser, U., Lehnert, G., Jauris-Heipke, S. (1998) Genospecies and their influence on immunoblot results. Wien Klin Wochenschr 110: 882-885
68. Wilske, B., Habermann, C., Fingerle, V., Hillenbrand, B., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Pradel, I., Rossler, D., Schulte-Spechtel, U. (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol (Berl) 188: 139-144
69. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 49: 13-21
70. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. Infect Immun 74: 5177-5184
71. Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T. (2007a) Identification of an ospC operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 64: 220-231
72. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2007b) Increasing the interaction of *Borrelia burgdorferi* with decorin significantly reduces the 50 percent infectious dose and severely impairs dissemination. Infect Immun 75: 4272-4281
73. Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten -Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.

11. 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