VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot

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

Nº de pedido: WE224G32; WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

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

Nº de pedido: WE224M32; WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

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

Nº de pedido: WE225G32; WE225G96

EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH
Waldstrasse 23 A6
63128 Dietzenbach, Alemania
Tel.: +49 6074 23698-0
Fax: +49 6074 23698-900
Correo electrónico: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com
Sitio web: clinical.goldstandarddiagnostics.com

CE

Freigabedatum: 18.09.2024 11:32
REV 14 / VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot ES

Índice

1. Finalidad....3
2. Principio de la prueba....3
3. Contenido....3
3.1 Kit para 32 determinaciones....3
3.2 Kit para 96 determinaciones....3
4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos....4
5. Medidas de precaución y advertencias....4
6. Material adicional necesario (no suministrado)....5
7. Material de muestra....5
8. Realización de la prueba....5
8.1 Preparación de las muestras....5
8.2 Preparación de los reactivos....5
8.3 Realización de la prueba de inmunotransferencia....6
8.4 Empleo de procesadores de inmunotransferencia....7
9. Valoración del ensayo....7
9.1 Evaluación de las muestras de paciente....7
9.2 Empleo del control de corte....7
9.3 Significado de los antígenos....7
9.4 Criterios de evaluación....9
9.5 Limitaciones del ensayo....11
10. Bibliografía....11
11. Símbolos....14
12. Esquema de la realización de la prueba....15

1. Finalidad

Kit de ensayo por inmunotransferencia de línea para la determinación cualitativa en suero humano de anticuerpos IgG o IgM específicos contra *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato.

Además de su uso en el diagnóstico serológico de la borreliosis de Lyme, IgG Line Immunoblot también puede emplearse para el diagnóstico de la neuroborreliosis en líquido cefalorraquídeo. Si desea utilizarlo para el diagnóstico en líquido cefalorraquídeo, solicite las correspondientes instrucciones específicas.

2. Principio de la prueba

Las proteínas del antígeno del organismo patógeno se transfieren sobre una membrana de nitrocelulosa mediante un procedimiento de pulverización especial. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se corta en tiras individuales.

La incubación de las tiras de nitrocelulosa portadoras de antígeno con muestras de suero/plasma humano permite la identificación de los anticuerpos específicos existentes. Estos anticuerpos forman complejos inmunitarios con los antígenos fijados en las tiras de prueba. Una vez eliminados los anticuerpos no ligados mediante pasos de lavado, las tiras de nitrocelulosa se incuban con anticuerpos IgG o IgM antihumanos conjugados con fosfatasa alcalina. Después de eliminar los anticuerpos conjugados no ligados mediante un paso de lavado adicional tiene lugar la visualización de los complejos antígeno-anticuerpo (de los anticuerpos ligados) mediante la adición de un sustrato incoloro que, al reaccionar con las enzimas, genera bandas azul-violeta (“bandas de antígeno”). La reacción enzima-sustrato se interrumpe lavando las tiras de nitrocelulosa con agua destilada o desionizada. En función de los patrones de bandas observados puede determinarse la presencia de anticuerpos IgG o IgM específicos.

3. Contenido

3.1 Kit para 32 determinaciones

1.	**Tiras de prueba de IgG / IgM nitrocelulosa** con antígenos aplicados, reforzadas con lámina de plástico, clasificadas en cuadernillos, listas para usar	**1x**	32 tiras
2.	**Control de nivel de corte IgG / IgM**, suero humano, prediluido	**1x**	1,0 ml
3.	**Tampón de dilución/lavado**, pH 7,3 (conc. 10x), con conservante y Tris	**2x**	50 ml
4.	**Conjugado IgG/ IgM** (concentración 100x) antihumano, (caprino)-fosfatasa alcalina, con conservante	**1x**	0,7 ml
5.	**Sustrato** (BCIP/NBT), listo para usar	**1x**	57 ml
6.	**Hoja de protocolo de valoración**, para protocolizar y archivar los resultados	**1x**	1 unidad

3.2 Kit para 96 determinaciones

1.	**Tiras de prueba de IgG / IgM nitrocelulosa** con antígenos aplicados, reforzadas con lámina de plástico, clasificadas en cuadernillos, listas para usar	**3x**	32 tiras
2.	**Control de nivel de corte IgG / IgM**, suero humano, prediluido	**2x**	1,0 ml
3.	**Tampón de dilución/lavado**, pH 7,3 (conc. 10x), con conservante y Tris	**4x**	50 ml
4.	**Conjugado IgG/ IgM** (concentración 100x) antihumano, (caprino)-fosfatasa alcalina, con conservante	**3x**	0,7 ml
5.	**Sustrato** (BCIP/NBT), listo para usar	**3x**	57 ml
6.	**Hoja de protocolo de valoración**, para protocolizar y archivar los resultados	**3x**	1 unidad

Bajo demanda puede suministrarse adicionalmente:

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

IgG o IgM	controles listos para usar	Abreviatura

1,0 ml IgG, o 1,0 ml IgM	neg. ctrl. / control negativo, suero/plasma humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para su uso	**NEG**
1,0 ml IgG, o 1,0 ml IgM	Cut off Ctrl. / Cut off control, suero/plasma humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para su uso	**CO**
1,0 ml IgG, o 1,0 ml IgM	pos. Ctrl. / control positivo, suero/plasma humano con estabilizadores de proteínas y conservante, listo para usar	**POS**

Las bandas positivas > Banda de corte se encuentran en el certificado suministrado.
El control negativo no muestra ninguna banda o ninguna banda relevante para la evaluación > Banda de corte.

4. Conservación y caducidad del kit y de los reactivos

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. No congele los reactivos ni los exponga a temperaturas elevadas.
2. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.
3. Evite conservar los reactivos en un lugar expuesto a luz intensa.
4. La solución de sustrato BCIP/NBT es fotosensible y debe conservarse en un lugar oscuro.
5. **Tiras de prueba de nitrocelulosa**: Utilice las tiras inmediatamente después de sacarlas de la bolsa. Vuelva a cerrar bien la bolsa con las tiras que no necesite y consérvela a 2-8°C. Para archivar los resultados, es imprescindible proteger las tiras de prueba de nitrocelulosa contra la incidencia directa de la luz solar, para evitar una descoloración de las bandas.

Material	Estado	Almacenamiento	Estabilidad
Muestras de análisis	sin diluir	de +2 hasta +8°C	1 semana
Tiras de análisis	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (almacenamiento en la bolsa suministrada)	3 meses
Controles	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
Conjugado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C	3 meses
	diluido	de +2 hasta +8°C	aprox. 6h
Sustrato	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegido contra la luz)	3 meses
Solución de lavado	tras la apertura	de +2 hasta +8°C (protegida contra la luz)	3 meses
	dilución final (lista para el uso)	de +2 hasta +8°C	4 semanas
	dilución final (lista para el uso)	o a temperatura ambiente	2 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, todos los sueros de control, muestras, muestras diluidas, conjugados y tiras de prueba de nitrocelulosa deben considerarse como material potencialmente infeccioso y manipularse con las correspondientes precauciones. Deberán seguirse las correspondientes directrices para trabajos de laboratorio.
2. Al realizar la inmunotransferencia deben utilizarse guantes desechables y pinzas de plástico.
3. Los materiales utilizados deberán eliminarse según la normativa de eliminación de residuos de cada país.
4. Las cubetas de incubación han sido diseñadas por el fabricante exclusivamente para un único uso. Si las cubetas de incubación se emplean más de una vez, la responsabilidad recae sobre el usuario. En caso de que se decida emplear las cubetas más de una vez, recomendamos que después de su uso se desinfecten durante varias horas en una solución de hipoclorito sódico al 1%, se limpien y se enjuaguen a fondo con agua corriente y posteriormente con agua destilada o desionizada.

6. Material adicional necesario (no suministrado)

1. Cubeta de incubación (disponible con el nº de pedido WE300.08)
2. Agitador (vertical, no centrífugo)
3. Frasco lavador para interrumpir la reacción
4. Pipeta o lavador manual
5. Micropipetas de 5 µl - 1500 µl
6. Puntas de pipeta
7. Tubos de ensayo, volumen 2-20 ml
8. Pinzas de plástico
9. Agua destilada o desionizada
10. Papel de filtro

7. Material de muestra

Como material de análisis se pueden utilizar suero o plasma (sin importar el tipo de anticoagulantes), aunque en el folleto sólo se mencione el suero. Para la utilización de líquido cefalorraquídeo, consulte las instrucciones de uso separadas de Liquor LINE.

8. Realización de la prueba

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

8.1 Preparación de las muestras

1. Para cada muestra de paciente son necesarios 15 µl de suero o de plasma. Durante el **procesamiento de líquido cefalorraquídeo/suero** sólo se debe utilizar para cada clase Ig la dilución de líquido cefalorraquídeo/suero separada, calculada individualmente (ver Instrucciones de uso de Liquor LINE).
2. Las muestras de sangre se deben extraer por punción venosa bajo condiciones asépticas. Tras la coagulación completa se debe separar el suero (no procede para el plasma). Para un almacenamiento más prolongado, los sueros deben congelarse a -20°C.
3. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas de los sueros.
4. Los sueros térmicamente inactivados o que presenten lipemia, hemólisis o contaminación microbiana pueden llevar a resultados incorrectos, por lo que no deben utilizarse.
5. No utilice muestras de suero turbias (especialmente después de la descongelación); en caso necesario, centrifúguelas (5 min a 1000 x g), pipetee el sobrenadante transparente y utilícelo para la prueba.

8.2 Preparación de los reactivos

1. Para la adaptación a la rutina de laboratorio se pueden utilizar todos los LINEs en un ciclo de prueba (con tiempos de incubación idénticos y parámetros y lotes de componentes similares). Los controles Cut off se realizan de forma específica para los parámetros y lotes.
2. Antes de diluir todos los reactivos de ensayo, el correspondiente reactivo concentrado debe llevarse a temperatura ambiente. Sólo debe utilizarse agua destilada o desionizada de alta calidad y a temperatura ambiente.
3. Antes de iniciar el ensayo, las diluciones deben mezclarse bien.
4. **Tampón de dilución/lavado**
   El tampón de dilución/lavado se suministra en una concentración de 10x. Diluya el concentrado de tampón de dilución/lavado al 1:10 con agua destilada o desionizada (10ml/50ml/100ml de concentrado + 90ml/450ml/900ml a. dest./desionizada) y mézclelo bien.
   Tanto el tampón de dilución/de lavado concentrado como el diluido pueden presentar una coloración amarilla. Esta coloración amarilla no afecta a la estabilidad del tampón de dilución/de lavado ni a la funcionalidad y capacidad diagnóstica de la preparación de ensayo.
5. **Conjugado IgG / IgM**
   Diluya el conjugado (1+100) con tampón para dilución/lavado ya diluido y mezcle bien. Por cada muestra de suero se necesitan 1,5 ml de solución de conjugado lista para usar. Consulte la tabla de dilución del conjugado (apartado “Esquema de la realización de la prueba”).

6. **Solución de sustrato**
   La solución de sustrato se suministra lista para usar.

8.3 Realización de la prueba de inmunotransferencia

Atención: Las tiras de prueba de nitrocelulosa sólo deben utilizarse para la clase Ig autorizada (véanse la etiqueta del cuadernillo de inmunotransferencia y la denominación en cada tira individual).

Para la realización y evaluación correctas de la prueba Borrelia Europe LINE debe utilizarse en todas las pruebas un control del nivel de corte específico para los parámetros y el lote correspondientes.

Para un diagnóstico seguro de Borrelia debe realizarse la prueba Borrelia Europe LINE para IgG e IgM.

1. La prueba se realiza a temperatura ambiente.
2. Por cada prueba, coloque 1 tira en la ranura de una cubeta de incubación limpia. En la medida de lo posible, la tira sólo debe sujetarse por el extremo superior marcado.
3. Pipetee en cada tira 1,5 ml de **tampón de dilución/lavado** listo para usar y colóquela en el agitador. Asegúrese de que las tiras de prueba de nitrocelulosa estén uniformemente cubiertas de líquido: no debe secarse en ningún momento del ensayo.
4. Las tiras de prueba de nitrocelulosa reforzadas están totalmente humedecidas al cabo de un minuto, y pueden incubarse hacia arriba, hacia abajo o de lado.
5. Agregar cada vez **15µl de suero/plasma de paciente** ó **100µl del control Cut off / positivo / negativo**, en lo posible en el extremo superior y marcado de la banda Incube el suero de paciente y el control durante **30 minutos** en el agitador. Durante el pipeteado y el posterior vertido debe prestarse atención a evitar contaminaciones cruzadas entre las distintas muestras de paciente.
6. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo cuidadosamente. El verter el líquido, las tiras de prueba de nitrocelulosa permanecen adheridas al suelo de las ranuras. Seque el líquido residual con papel absorbente.
7. **Lave** las tiras: incúbelas **3 veces durante 5 minutos** en el agitador con 1,5 ml de tampón de dilución/lavado listo para usar por cada vez. Aspire o vierta siempre el tampón de lavado en su totalidad. Antes de realizar el último paso de lavado, prepare la cantidad necesaria de conjugado diluido fresco (véase tabla).
8. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo (véase el punto 6).
9. Pipetee 1,5 ml del **conjugado diluido** preparado en cada ranura de incubación e incube durante **30 minutos** en el agitador.
10. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo.
11. **Lave** las tiras: incúbelas **3 veces durante 5 minutos** en el agitador con 1,5 ml de tampón de dilución/lavado listo para usar por cada vez. Aspire o vierta siempre el tampón de lavado en su totalidad. A continuación, lávelas **1 vez durante 1 minuto** con **agua destilada/desionizada**.
12. Aspire por completo el líquido de las ranuras o viértalo (véase el punto 6).
13. Pipetee 1,5 ml de **solución de sustrato** lista para usar en cada ranura y revele las tiras durante **10 ± 3 minutos** en el agitador.
14. **Interrumpa** el revelado del color vertiendo la solución de sustrato. A continuación, lave **3 veces** las tiras sin incubación intermedia con 1,5 ml de **agua destilada/desionizada** cada vez.
15. Vierta el agua destilada/desionizada y seque las tiras sobre un papel absorbente limpio. La coloración de fondo que puede observarse en las tiras de prueba de nitrocelulosa húmedas desaparece por completo al secarse. En comparación con las tiras de prueba de nitrocelulosa normales, las tiras de prueba de nitrocelulosa reforzadas tardan algo más en secarse.
16. Utilice el protocolo de valoración adjunto para la evaluación. Las indicaciones que figuran en las bandas altamente específicas en la hoja de protocolo facilitan la evaluación de las muestras de paciente.

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

8.4 Empleo de procesadores de inmunotransferencia

Para el procesamiento automatizado de los Blot y de las LINE se han validado los equipos siguientes: Apollo y Profiblot. Por principio son adecuados todos los equipos automáticos para Blot de tipo usual en el comercio.

9. Valoración del ensayo

Para la valoración segura, cada tira LINE está equipada con dos controles:

1. **Control de suero** (= serum control)**:**
   La marca de incubación con suero debajo de la línea de marca (= markline) sólo aparece después de incubar la tira con suero de paciente.
2. **Control de conjugado** (= conjugate control)**:**
   La tira LINE está dotada de una banda de control de conjugado que aparece después de la incubación con el correspondiente conjugado.

La prueba realizada es válida si, una vez revelada, en la tira de prueba de nitrocelulosa aparecen claramente tanto la banda de control de suero como la de control interno de conjugado.
La posición de las bandas de control de suero y de conjugado se indican en la hoja de protocolo.

9.1 Evaluación de las muestras de paciente

La posición y denominación de las bandas reactivas se indican en la hoja de protocolo.
Bandas IgM: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix y una banda EBV para descartar el diagnóstico de infección por virus de Epstein-Barr.
Bandas IgG: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix o DbpA-PKo, p58, p83 y una banda TpN17 para el diagnóstico de exclusión (sólo en WE 225G)

9.2 Empleo del control de corte

Las bandas cuya intensidad sea menor que la banda del control de corte no deben tenerse en cuenta para la valoración.
Banda de corte IgM: OspC
Banda de corte IgG: VlsE-Mix

9.3 Significado de los antígenos

Relación de los antígenos altamente depurados y recombinantes *Borrelia burgdorferi*, el EBV-**V**iral **C**apsid **A**ntigen gp125 y el antígeno TpN 17. El VlsE-Mix consiste en dos antígenos recombinantes de las genoespecies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto y *Borrelia garinii*. La mezcla DbpA está compuesta por la genoespecie recombinante *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis***,** *Borrelia spielmanii* y por *Borrelia afzelii* altamente purificada.

Antígeno/ Denominación	**Significado de los antígenos**	**Especificidad de los anticuerpos en LINE**	**Cepas originales/Purificación**
OspC (p23) altamente purificada	**O**uter **s**urface **p**rotein **C**. Lipoproteína codificada por plásmido (6, 22, 26, 28). Marcador importante para manifestaciones tempranas de la borreliosis de Lyme, sobre todo en serología IgM (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). Significado biológico: Presuntamente *B. burgdorferi* s. l. requiere OspC para una infección inicial exitosa del huésped mamífero (48, 63, 70, 71). Las espiroquetas expresan OspC durante la alimentación con sangre en la garrapata y en la fase temprana de la infección del huésped mamífero (48). Después de la transmisión de la espiroqueta al mamífero, vuelve a disminuir la expresión de OspC. La lipoproteína no parece ser necesaria para una infección persistente	Específico (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (aislada originariamente de una lesión humana provocada por eritema migratorio en Alemania) / purificada a través de una SDS-Page preparatoria

	(48, 63). Tilly et al. suponen que la OspC impide la fagocitosis de las espiroquetas durante la fase temprana de la infección (64).		
VlsE recombinante	**V**ariable major protein **l**ike **s**equence **E**. Lipoproteína expresada *in vivo* que presenta epítopos conservados altamente inmunogénicos entre genoespecies. En la serología IgM se observan reactividades frente a VlsE, especialmente en sueros de pacientes con borreliosis de Lyme temprana. En la serología IgG se observan reactividades frente a VlsE, en sueros de pacientes con borreliosis de Lyme temprana y avanzada. VlsE actúa en la serología IgG como marcador de la borreliosis de Lyme en todos los estadios de la enfermedad. VlsE es una antígeno de 35 kDa codificado por lp28-1 (2). Significado biológico: *B. burgdorferi* s.l. puede perdurar en mamíferos infectados a pesar de su respuesta inmunitaria activa. Se sospecha que la variación combinatoria de antígenos de la proteína de superficie VlsE contribuye, como mecanismo de "escape inmunológico", a esta persistencia (42, 44, 56).	Específico	*B. burgdorferi* B31 (aislada originariamente de una garrapata infectada en Shelter Island, N. Y.*), B. garinii* IP90 (aislada originariamente de una garrapata infectada en Rusia) / Extraída de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA
p39 (BmpA) recombinante	**B**orrelial **m**embrane **p**rotein **A**. Marcador central codificado por cromosomas (6, 19) en serología IgG para infecciones diseminadas de borreliosis de Lyme (4, 8, 18). Las proteínas Bmp son lipoproteínas con función desconocida (43, 57, 62).	Altamente específico (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (aislada originariamente de una lesión humana provocada por eritema migratorio en Alemania)/extraída de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA
DbpA altamente purificada (DbpA Pko)/ recombinante (DbpA PBi, PBr, A14 S)	**D**ecorin **b**inding **p**rotein **A** (también Outer surface protein 17 o p17). Lipoproteína codificada por plásmido. Las DbpAs procedentes de distintos aislados de las especies humano-patógenas *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii, B. bavariensis* y *B. spielmanii* se han descrito como antígenos sensibles y específicos que complementan mutuamente su reactividad (47, 60, 61, 69). Son marcadores en serología IgM y IgG, sobre todo para neuroborreliosis y artritis de Lyme (50, 52, 57, 58, 59, 60). Significado biológico: La adhesión microbiana al tejido del huésped representa un paso temprano crítico en la patogenia de la mayoría de las enfermedades infecciosas. Las diferentes especies de Borrelia expresan en la superficie dos adhesinas de	Altamente específico	*B. bavariensis* PBi y *B. garinii* PBr (originariamente aisladas de líquido cefalorraquídeo de un paciente con neuroborreliosis en Alemania), *B. spielmanii* A14S (originariamente aislada de una lesión provocada por eritema migratorio en los Países Bajos)/extraída de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA *B. afzelii* PKo (aislada originariamente de una lesión humana provocada por eritema migratorio en Alemania)/extraída a través

	unión a decorinas, DbpA y B, que facilitan la unión de las espiroquetas a la matriz extracelular del huésped. Las borrelias llegan a la dermis a través de la saliva de la garrapata y se unen allí a las fibras de colágeno o al proteoglucano decorina asociado al colágeno a través de las adhesinas A y B de unión a decorinas (46, 49, 72).		de una SDS-Page preparatoria
p58 (OppA-2) recombinante	**O**ligopeptide **p**ermease **p**rotein **A**-2 (OppA-2). Lipoproteína de codificación cromosómica que se conserva entre las especies (54). Marcador importante en serología IgG-Serologie para las borreliosis de Lyme avanzadas (47, 51, 57, 67, 68). Significado biológico: OppA es un transportador de membrana que posiblemente desempeñe un papel en la adaptación de *B. burgdorferi* s. l. al entorno del huésped (55, 66).	Altamente específico	*B. bavariensis* PBi (originariamente aislada de líquido cefalorraquídeo de un paciente con neuroborreliosis en Alemania) Extraída de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA
p83/100 recombinante	Antígeno de codificación cromosómica asociado a cilindros protoplasmáticos (12, 13), conservado dentro *de B. burgdorferi* s. l. (17). Marcador central en serología IgG para borreliosis de Lyme avanzadas (8, 24, 29).	Altamente específico (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	*B. afzelii* PKo (aislada originariamente de una lesión humana provocada por eritema migratorio en Alemania)/extraída de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA
EBV VCA-gp125 purificado por afinidad	Antígeno de cápside viral (**V**irus **C**apsid **A**ntigen) inmunodominante del virus de Eppstein Barr. Por regla general, los anticuerpos IgM frente a VCA-gp125 vuelven a desaparecer algunas semanas después de la infección por el virus de Eppstein Barr (VEB).	Marcador altamente específico en serología IgM para una infección primaria por VEB	La purificación de gp125 se realiza a partir de un lisado de células enteras (células humanas infectadas por VEB) mediante cromatografía de afinidad, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-gp125
Treponema pallidum ***TpN17 recombinante (solo en WE225G)***	Marcador para la sífilis primaria, secundaria y latente	altamente específico para todos los estadios de infección	*Treponema pallidum/* Extraído de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA

9.4 Criterios de evaluación

La interpretación de resultados serológicos debe tener siempre en cuenta el cuadro clínico, los datos epidemiológicos y otros resultados analíticos existentes.

Sólo se consideran positivas las bandas cuya intensidad sea mayor o igual a la de la banda de control del nivel de corte.

Valoración IgM recomendada[1]

Banda(s) aparecida(s)	**Valoración**
Aparición de ≥ 2 bandas de las siguientes: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix **o bien** OspC aislado (p23)	**positivo**
Sólo una banda de: p39 BmpA, DbpA-Mix, VlsE-Mix	**valor limítrofe**
Ninguna de las siguientes bandas ≥ bandas Cut off: p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	**negativo**

Valoración IgG recomendada[1]

Banda(s) aparecida(s)	**Valoración**
Aparición de ≥ 2 bandas de las siguientes: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix **y/o** DpbA-PKo VisE-Mix	**positivo**
Sólo una banda de: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix **y/o** DpbA-PKo VisE-Mix	**de valor límítrofe**
Ninguna de las siguientes bandas ≥ bandas cut off: p83/100, p58 (OppA-2), p39 BmpA, OspC (p23), DbpA-Mix **y/o** DpbA-PKo VisE-Mix	**negativo**

* **Ambas bandas DbpA (Mix y PKo) son valoradas en IgG conjuntamente como 1 banda**

Valoración recomendada en caso de VCA-gp125 positivo en la serología IgM

Dentro del marco de una infección primaria EBV, puede haber, por la estimulación policlonal de células B, reactividades de anticuerpos contra antígenos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. De ello puede resultar un hallazgo positivo falso de borreliosis de Lyme. A fin de reducir a un mínimo los diagnósticos falsos, el VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot contiene el Epstein Barr **V**iral **C**apsid **A**ntigen gp125. Si reaccionan simultáneamente, aparte de gp125, también los antígenos de borreliosis (en el IgM y/o el IgG) con una intensidad ≥ de las bandas cut-off de IgM-Bande, conviene, para estar seguro, comprobar el estado EBV completo del suero (p. ej. con el VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; art. no.: WE102G32/96 e VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot: art. no.: WE102M32/96).

Valoración recomendada de la banda TpN17

Banda de antígeno TpN17 *Treponema pallidum* **(sólo en WE225G)**

En el serodiagnóstico de borreliosis de Lyme se observan reacciones cruzadas con otros microorganismos. A este respecto desempeñan un papel importante las infecciones por virus del herpes (especialmente EBV) así como las enfermedades

[1] según MIQ 12/2000 y DIN 58969-44, julio de 2005 [7,73]

bacterianas como la sífilis. La borreliosis de Lyme MiQ12/2000 recomienda: "En caso de ensayo de valor limítrofe o positivo (nota: de la serología de borreliosis de Lyme) debe practicarse un ensayo de Lues (p. ej. TPHA) para excluir los hallazgos positivos falsos por anticuerpos de reacción en cruz a treponomas."
La banda TpN17 sirve para identificar resultados falsos positivos/de valor limítrofe en el serodiagnóstico de borreliosis de Lyme por anticuerpos de reacción cruzada a raíz de una infección con *Treponema pallidum* (sífilis).

Si en VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot reacciona la banda TpN17 ≥ la banda cut-off IgG y a la vez antígenos a borrelias en IgM y/o en IgG , conviene, para estar seguro, comprobar el estado de sífilis completo del suero (p. ej. con VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot e VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot WE150).

Debe tenerse en cuenta imprescindiblemente:

a. La banda TpN-17 no puede sustituir, en cuanto a sensibilidad y especificidad, un diagnóstico diferencial completo de la sífilis.
b. Una banda de antígeno negativo de TpN17 no excluye en principio la posibilidad de la existencia de anticuerpos contra *Treponema pallidum*.
c. Un resultado positivo de las bandas de antígeno TpN17 debe ser confirmado por ensayos de confirmación adecuados de *Treponema pallidum* (p. ej.: VIROTECH WE150).
d. La banda TpN-17 no ha sido validada para una aplicación en el diagnóstico del líquido cefaloespinal.

9.5 Limitaciones del ensayo

1. Un resultado negativo de la inmunotransferencia no permite descartar por completo la posibilidad de una borreliosis. La muestra puede haberse extraído antes de la aparición de anticuerpos, o el nivel de anticuerpos puede encontrarse por debajo del límite de detección del ensayo.
2. El tratamiento antibiótico en la fase temprana de la enfermedad (35, 37) puede provocar una supresión de la respuesta inmunológica que impida detectar anticuerpos específicos contra *Borrelia burgdorferi* .
3. La reacción cruzada entre *Borrelia* y otros espiroquetos puede provocar la aparición de bandas asociadas a borrelias, lo que puede inducir a un resultado positivo falso. Los sueros de pacientes con, por ejemplo, las siguientes infecciones, pueden acusar reacciones cruzadas: sífilis (*Treponema pallidum*), frambesia (*Treponema pertenue*), fiebre recurrente (*Borrelia* spez.), leptoespirosis (*Leptospiren* spez.) (38). Asimismo pueden aparecer reacciones cruzadas en los virus del herpes (HSV, CMV) y en el parvovirus (34, 39). Si en VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE225G) aparece aparte de reactividades contra los antígenos de borreliosis de Lyme también reactividad contra el antígeno TpN17, deben tenerse en cuenta los avisos indicados en el apartado 9.4 (Valoración recomendada de las bandas TpN17).
4. Dentro del marco de una infección primaria EBV, puede haber, por la estimulación policlonal de células B, reactividades de anticuerpos contra antígenos de *Borrelia burgdorferi* sensu lato. (34, 39). Si en VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot se observa, aparte de las reactividades contra antígenos de borrelias (IgM y/o IgG), también reactividad contra EBV-gp125, debe excluirse mediante diagnóstico diferencial una mononucleosis.
5. En casos poco frecuentes, los sueros de pacientes pueden presentar bandas “invertidas” (fondo oscuro, bandas blancas); si ocurre esto no es posible evaluar la prueba. En ese caso, el suero debe analizarse mediante otros métodos serológicos.

10. Bibliografía

1. Aguero-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 seradiagnosis 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 antibodys 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 immundominant protoplasma 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 varability 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-Krankeit) 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. 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., Heikkila, 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., Sillanpaa, 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., Seemanaplli, 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. Símbolos

Consulte las instrucciones de uso.

12. Esquema de la realización de la prueba

Resumen de la realización de la prueba:

Incubación de muestras	**30 minutos**	15 µl de suero/plasma del paciente/100 µl de control en cada caso en 1,5 ml de tampón de dilución/lavado
Lavado	**3 x 5 minutos**	con 1,5 ml de tampón para dilución/lavado en cada caso
Incubación de los conjugados	**30 minutos**	con 1,5 ml de dilución para el uso (1 + 100)
Lavado	**3 x 5 minutos**	con 1,5 ml de tampón para dilución/lavado en cada caso
	1 x 1 minuto	con agua destilada/desionizada
Incubación del sustrato	**10 ± 3 minutos**	con 1,5 ml de solución de sustrato en cada caso
Parada	**3 x sin incubación intermedia**	con 1,5 ml de agua destilada/desionizada en cada caso

Tabla para dilución de conjugado: (valores redondeados)

Número de tiras	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Tampón de dilución/lavado	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Conjugado concentrado	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Volumen 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**
Tampón de dilución/lavado	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Conjugado concentrado	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Volumen 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**
Tampón de dilución/lavado	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Conjugado concentrado	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Volumen 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**
Tampón de dilución/lavado	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Conjugado concentrado	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Volumen final	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml