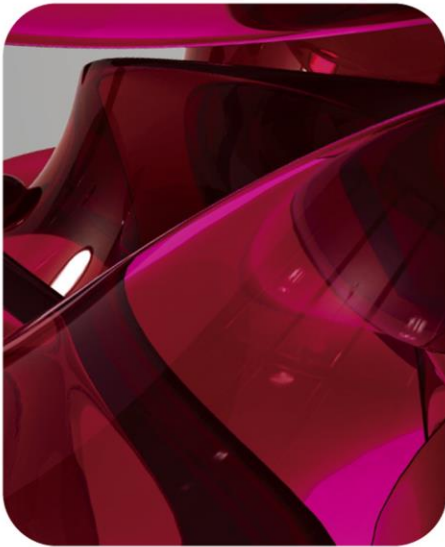




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUBLOTS®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKUBLOTS® Borrelia-G/-M

Ref 4006 / 4007



Ref. do produto	4006/4007
Desc. do produto	Borrelia-G/-M
N.º Rev. do Manual	009 : 2018-04-04

Manual de Instruções

Conteúdo

1	Utilização	1
2	Aplicações clínicas e princípio do ensaio	1
3	Componentes do Kit	2
4	Armazenamento e validade	3
5	Avisos e medidas de precaução	3
6	Recolha da amostra, manipulação e armazenamento	4
7	Procedimento do teste	5
8	Interpretação qualitativa.....	7
9	Dados Técnicos	8
10	Dados do teste / Características do teste.....	8
11	Bibliografia.....	9



1 Utilização

AESKUBLOTS® Borrelia-G/M é um imunoensaio enzimático sensível baseado em membrana para detecção qualitativa de IgG/M específico contra *Borrelia burgdorferi* no soro humano. Os antígenos estão localizados em linhas paralelas, em posições definidas de forma exata, numa membrana de nitrocelulose.

O ensaio é uma ferramenta para confirmar os resultados ELISA positivos.

2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

A doença de Lyme é uma doença multissistêmica por infecção com espiroquetas *Borrelia burgdorferi*. Este patógeno foi descoberto em 1981 por Willy Burgdorfer (Burgdorfer et al., 1982). Até agora, a doença foi classificada em três fases (Fase I: Sintoma de eritema migratório, Fase II: manifestações clínicas precoces após disseminação do patógeno, Fase III: com manifestações tardias). No entanto, esta classificação é obsoleta porque os sintomas de várias etapas sobrepõem-se. Hoje, é possível distinguir uma manifestação precoce e tardia da doença. A fase precoce corresponde à fase I / II da classificação anterior e a fase tardia da fase III. Os sintomas tardios podem ser graves e o tratamento com antibióticos é difícil. Por estas razões, o diagnóstico precoce é de grande importância.

O vetor principal de *Borrelia* na Europa é a carraça comum *Ixodes ricinus*, Genus: *Ixodidae* (carraça). De acordo com a sua ocorrência em áreas de floresta densa, a doença instala-se aqui, principalmente no verão e outono. Assim que a carraça tirar sangue, os patógenos multiplicam-se no seu intestino médio. Consequentemente, as bactérias migram para a glândula salivar e são injetadas com a saliva na ferida.

O diagnóstico da forma precoce é baseado no sintoma clínico de Eritema Migratório. No entanto, este sintoma está em falta em 20 a 40 % dos pacientes. Mais ainda, os sintomas em fases posteriores são muito diversos. Os testes serológicos são, assim, um fator importante de diagnóstico. Apesar da prova mais certa ser a recolha de patógenos do sangue, fluido cérebro-espinhal ou biópsia de pele, este teste não é qualificado para diagnóstico de rotina devido à sua longa duração e baixa sensibilidade. Devido à falta de um teste padrão de borreliose, a Sociedade Alemã para a Higiene e Microbiologia (DGHM) recomenda atualmente a execução de um procedimento de teste de duas fases (MIQ Lyme Borreliosis), que requer uma avaliação de diagnóstico inicial (normalmente ELISA) seguida de uma confirmação de resultado ELISA positivo ou duvidoso através de um teste adicional (1) como o Western blotting.

Antígenos utilizados:

Nomenclatura dos antígenos de borrelia	Propriedades das proteínas	digitar	origem
p100	Proteína de membrana-vesículas	rec	B. afzelii
VlsE	variable major protein-like sequence Expressed (Sequência tipo proteína principal variável expressa)	rec	B. afzelii
p58	não caracterizado	rec	B. garinii
p41 (Flagelina)	proteína estrutural de endoflagelina	rec	B. burgdorferi sensu stricto
p39 (BmpA)	Complexo de flagelos <i>Borrelia</i> membrane protein A (Proteína de membrana da <i>Borrelia</i>)	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii
p31 (OspA)	Outer surface, protein A (Superfície externa, Proteína A)	rec	B. afzelii

Nomenclatura dos antígenos de borrelia	Propriedades das proteínas	digital	origem
p23 (OspC)	Outer surface protein C, (Superfície externa, proteína C) Mistura de diferentes subtipos de borrelia	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. bavariensis, B. afzelii, B. spielmanii
p18 (DbpA)	Decorin binding protein A (Proteína A de ligação de decorina)	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, B. spielmanii, B. bavariensis

Princípio do teste

Os antígenos são aplicados como linhas na membrana de nitrocelulose. A membrana está bloqueada para evitar reações não específicas. As tiras de membrana com antígenos específicos em posições definidas de forma exata são incubadas em amostras de soro diluído 1:101. Os anticorpos do paciente, se presentes na amostra, ligam-se ao antígeno. A parte não ligada é eliminada na etapa seguinte. Em seguida, as imunoglobulinas anti-humanas conjugadas com peroxidase de rábano (conjugado) são incubadas e reagem com o complexo antígeno-anticorpo das amostras. O conjugado não ligado é eliminado na etapa seguinte. Depois de adicionar o substrato de TMB, este é convertido em precipitado azul através de uma reação enzimática. A reação para com água destilada.

3 Componentes do Kit

DILUIR ANTES DE USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Tampão de lavagem e de amostra (5x)	2x 100 ml	branco	incolor	5x concentrado para preparação de 1 L
PRONTO A USAR				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Conjugado, IgG (Ref 4006)	1 x 10 ml	azul	roxo	Contém: Imunoglobulina anti-humana G (IgG) conjugada com peroxidase de rábano
Conjugado, IgM (Ref 4007)	1 x 10 ml	verde	verde	Contém: Imunoglobulina anti-humana M (IgM) conjugada com peroxidase de rábano
Substrato TMB	1 x 10 ml	preto	incolor	TMB/H ₂ O ₂ Estabilizado
Tiras de membrana	24 tiras	codificação de cor: verde	N/A	Antígenos revestidos consultar Aplicação Clínica e Princípio do Teste
câmara de incubação	3 pçs.	N/A	N/A	N/A
pinça, modelo de referência, ficha de resultados	1 pç. cada	N/A	N/A	N/A
MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS				
plataforma de oscilação, cilindro de 1000 ml, pipeta ou cilindro para 10 ml, pipetas de precisão (10, 1000 µl), papel absorvente ou de filtro. Os nossos testes foram concebidos para utilização com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4. ^a ed.).				

4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e tiras de membrana devem ser armazenados nas suas embalagens originais a 2-8 °C/35-46 °F. Depois de preparados, as soluções reconstituídas são estáveis durante 4 semanas a 2-8 °C/35-46 °F. Os reagentes e as tiras devem ser utilizados apenas dentro do prazo de validade indicado em cada componente. Não utilize componentes depois das datas de validade. Evite a exposição intensa da solução TMB à luz.

5 Avisos e medidas de precaução

5.1 Risco para a saúde

Este produto destina-se apenas a utilização para DIAGNÓSTICO IN VITRO. Desta forma, apenas pessoal com formação e especialmente treinado em métodos de diagnóstico in vitro pode executar o kit. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso quando se respeitam as condições de utilização, consulte o seguinte para máxima segurança:

Recomendações e medidas de precaução

Este kit contém componentes potencialmente perigosos. Apesar dos reagentes do kit não estarem classificados como sendo irritantes para os olhos e a pele, recomendamos que evite o contacto com os olhos e a pele e use luvas descartáveis.

O tampão de lavagem, o conjugado e o substrato contêm kathon (1 % v/v) como conservante. Não devem ser ingeridos nem devem entrar em contacto com a pele ou a membrana mucosa.

Não fume, coma ou beba ao manusear o kit. Não utilize a pipeta com a boca.

Manuseie as amostras do paciente como se fossem capazes de transmitir doenças infecciosas, e em conformidade com os requisitos nacionais.

5.2 Avisos gerais

Para diferenciar entre os vários testes **AESKUBLOTS®** disponíveis, aplica-se uma codificação de cor acima da linha de referência:

Codificação de cor	AESKUBLOTS®
vermelho	ANA-17 Comp
naranja	ANA-17 Pro
azul	Myositis Pro
castanho	Liver Pro
roxo	Vasculitis Pro
preto	Gastro Pro
verde	Borrelia-G and Borrelia-M

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, estejam incorretas, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

O tampão de lavagem e de amostra podem ser trocados entre lotes e kits de teste. Todos os restantes componentes são específicos para cada kit de teste e não podem ser trocados.

Ref. do produto	4006/4007
Desc. do produto	Borrelia-G/-M
N.º Rev. do Manual	009 : 2018-04-04

Não troque os componentes do reagente entre os testes de diagnóstico de autoimunidade e borrelia!

Permita que todos os componentes atinjam a temperatura ambiente (20-32 °C/68-89,6 °F) antes da utilização, misture bem e siga o esquema de incubação recomendado para um desempenho ideal do teste.

Nunca exponha componentes a uma temperatura superior a 37 °C/ 98,6 °F.

Pipete sempre a solução de substrato apenas com seringas completamente novas. Proteja este reagente da luz. Nunca pipete conjugado com seringas utilizadas anteriormente com outros reagentes.

A intensidade da cor da banda não se correlaciona necessariamente com títulos de anticorpos obtidos com outras metodologias de referência.

As amostras de doadores de sangue aparente normal podem conter auto-anticorpos.

Se a amostra do paciente contém níveis elevados de complexos imunes ou outros agregados de imunoglobulina, resultados positivos falsos através de ligação não específica não podem ser excluídos.

Um diagnóstico clínico definitivo não deve basear-se apenas nos resultados do teste executado, mas deve fazer-se pelo médico após avaliação de todos os resultados clínicos e laboratoriais. O diagnóstico deve ser verificado utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

Utilize preferencialmente amostras de soro frescas. A colheita de sangue deve cumprir as prescrições legais vigentes no seu país. Não use amostras ictéricas, lipêmicas, hemolisadas ou que sofreram contaminação bacteriana. O soro com partículas deve ser limpo através de centrifugação a velocidade baixa (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser colhidas em tubos limpos, secos e vazios.

Após a separação, as amostras de soro devem utilizar-se durante as primeiras 8 h. Em alternativa, as amostras devem armazenar-se em frascos devidamente fechados a 2-8 °C/35-46 °F até 48h, ou congelados a -20 °C/-4 °F para períodos mais longos. Evite congelar e descongelar várias vezes. Não aqueça amostras inativas. (Thomas: Labor und Diagnose; CLSI Guideline GP44-A4 Vol. 30 No. 10).

7 Procedimento do teste

7.1 Preparação

Dilua o tampão de lavagem de concentrado 1 + 4 com água destilada (por ex. 20 ml mais 80 ml).

7.2 Passos de teste

Notas importantes:

Siga exatamente este protocolo. Certifique-se de que os dois componentes mencionados no protocolo são adicionados à bandeja no passo 6, 9.

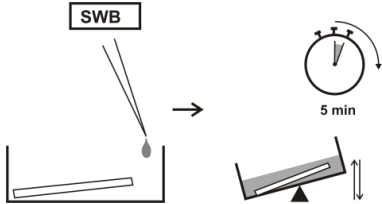
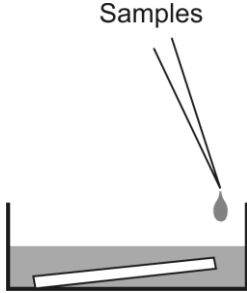
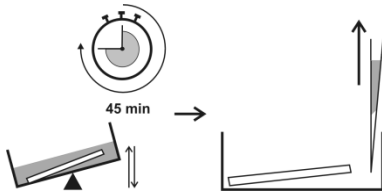
Não deixe a tira secar durante os passos da incubação.

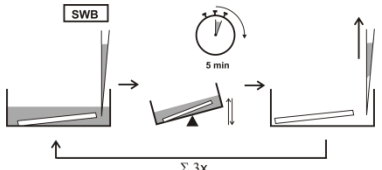
Não toque na tira com os dedos. Utilize pinças.

Retire completamente amostras diluídas depois da incubação da tira para evitar transporte.

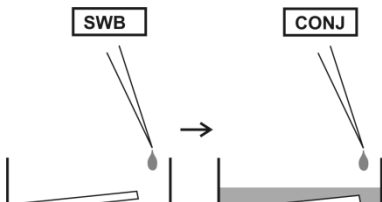
Agite a tira continuamente durante os passos de incubação.

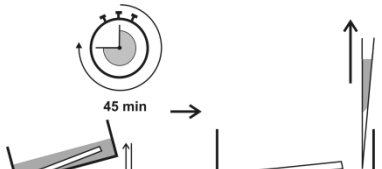
Coloque o tampão de amostra, o conjugado e o substrato juntamente com o tampão de lavagem num dos lados da bandeja de incubação. Não permita que passe por cima da tira.

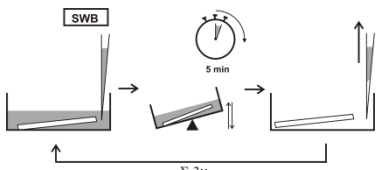
Passo	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes do início do teste.
2.	 Coloque a tira na orientação correta na bandeja de incubação (linha de referência e codificação de cor para cima). Humedeça a tira com 1 ml de tampão de amostra e lavagem e incube por 5 minutos com agitação.
CONTROLOS E AMOSTRAS	
3.	 Pipete 10 µl da amostra de soro nas bandejas de incubação designadas com o tampão de amostra.
4.	 Incube durante 45 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F com agitação. Depois disso, retire a amostra completamente.

- 5.
- 
- Lave 3 vezes durante 5 minutos com 1,5 ml de tampão de lavagem através de agitação. Retire o tampão de lavagem após cada passo de lavagem.

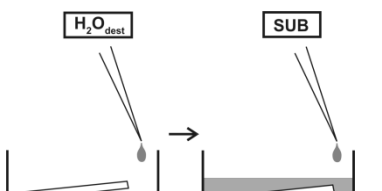
CONJUGADO

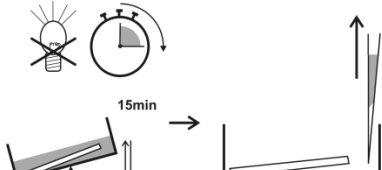
- 6.
- 
- Pipete 700 µl de tampão de lavagem e 300 µl de conjugado em cada bandeja de incubação com tira.

- 7.
- 
- Incube durante 45 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F com agitação. Retire o conjugado.

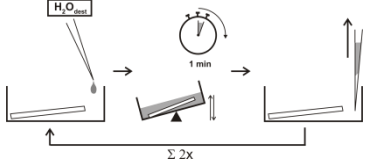
- 8.
- 
- Lave 3 vezes durante 5 minutos com 1,5 ml de tampão de lavagem através de agitação. Retire o tampão de lavagem após cada passo de lavagem.

SUBSTRATO

- 9.
- 
- Pipete 700 µl dH₂O e 300 µl de substrato em cada bandeja de incubação com tira.

- 10.
- 
- Incube durante 15 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F, com agitação, protegida de luz intensa. Retire o substrato.

PARAGEM

- 11.
- 
- Pipete 2 ml dH₂O em cada bandeja de incubação com tira. Incube 1 minuto com agitação. Retire o dH₂O. Repita este passo uma vez.
12. Retire a tira da bandeja de incubação. Seque a tira entre o papel do filtro
13. Interprete a tira seca no espaço de 6 horas.

8 Interpretação qualitativa

8.1 Análise Manual

Em cada tira de teste **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M** diferentes bandas de controlo são aplicados.

- 1.) Duas bandas de controlo de função no topo e no fundo da tira. (reação fortemente positiva com cada amostra de soro)
- 2.) Controlos de conjugado IgG e IgM (reação fortemente positiva com conjugado correspondente. Dependendo do soro utilizado, o outro controlo de conjugado pode desenvolver uma coloração não específica fraca).
- 3.) Controlo de corte cuja intensidade é utilizada para a avaliação de resultados das bandas de diagnóstico.

Os resultados do teste podem considerar-se válidos, se:

- os controlos funcional são visíveis
- o controlo de corte for visível
- E o controlo de conjugado correspondente se tornar visível

Fixe a tira seca na ficha de resultados alinhada com a linha de referência (membrana adesiva). Alinhe o modelo de referência com a linha de referência da tira. Interprete os resultados apenas com referência ao controlo de corte de cada tira.

Interprete os resultados do **AESKUBLOTS® Borrelia-G** desta forma:

Interpretação	IgG
negativo	1 banda exceto VlsE > Corte
no limite	VlsE ou 1 banda + p41 ≥ Corte
positivo	2 bandas exceto p41 ≥ Corte

Interprete os resultados do **AESKUBLOTS® Borrelia-M** desta forma:

Interpretação	IgM
negativo	Nenhuma banda exceto p41 > Corte
no limite	1 banda exceto OspC ou p41 ou p18 ≥ Corte
positivo	OspC ou p18 ou 2 duas outras bandas ≥ Corte

Os resultados podem registar-se na ficha de resultados.

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido.

Devem também verificar-se as seguintes questões técnicas: prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas, equipamento, condições de incubação e métodos de lavagem.

Se as amostras testadas mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de validação não forem cumpridos por razões que não são da responsabilidade do operador, contacte o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Os laboratórios médicos podem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um "pool" de soros interno segundo os regulamentos nacionais.

9 Dados Técnicos

Material de amostra:	soro
Volume de amostra:	10 µl de amostra
Tempo de incubação total:	142 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F
Armazenamento:	a 2-8 °C/35-46 °F; utilize apenas frascos originais.
Número de determinações:	24 testes

10 Dados do teste / Características do teste

10.1 Sensibilidade e Especificidade Relativas

80 soros de pacientes com suspeita de Borreliose de Lyme foram investigados num estudo comparativo utilizando **AESKUBLOTS® Borrelia G/M** e outro imunoensaio de linha comercial.

n = 80		outro imunoensaio comercial de linha	
		positivo	negativo
AESKUBLOTS® Borrelia-G/M	positivo	52	7
	negativo	2	19

Uma concordância positiva (sensibilidade relativa) de 96,2 % foi determinada entre os ensaios.

Para além disso, os soros discrepantes foram examinados noutra teste blot. Os resultados estavam conformes ao **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

Para além disso, num estudo comparativo, 32 soros de paciente com suspeita de infeção recente de borrelia foram examinados no **AESKUBLOTS® Borrelia-M** e um outro imunoensaio de linha comercial.

n = 32		imunoensaio comercial de linha	
		positivo	negativo
AESKUBLOTS® Borrelia- M	positivo	9	3
	negativo	1	19

Uma concordância positiva (sensibilidade relativa) de 90 % foi determinada entre os ensaios.

Para além disso, os soros discrepantes foram examinados noutra teste blot. Dois dos três soros eram positivos. O soro negativo foi também confirmado.

A fim de determinar a concordância negativa (especificidade relativa), 400 dadores de sangue saudáveis foram investigados utilizando **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

35 foram considerados positivos para IgG com **AESKUBLOTS® Borrelia-G**. Isto significa **91,3 %**.

11 foram considerados positivos para IgM com **AESKUBLOTS® Borrelia-M**. Isto significa **97,3 %**.

11 Bibliografia

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982). Lyme disease – A tick-borne spirochetosis?. Science. 216:1317–1319.

Para leitura posterior:

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC (1995). Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol. 33:419–27.

Wilske B (2005). Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. Annals of Medicine. 37,8: 568–579.

Stanek G, Strle F (2003). Lyme borreliosis. Lancet. 362: 1639–1647.

Lothar Thomas: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., 8. Auflage, TH Books

CLSI Guideline GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests

IVD	“ Diagnosi in vitro	“ For in vitro diagnostic use
	“ Pour diagnostic in vitro	“ Para uso diagnóstico in vitro
	“ In Vitro Diagnostikum	“ In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	“ Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	“ Numero d'ordine	“ Catalogue number
	“ Référence Catalogue	“ Numéro de catálogo
	“ Bestellnummer	“ Αριθμός παραγγελίας
	“ Número de catálogo	
LOT	“ Descrizione lotto	“ Lot
	“ Lot	“ Lote
	“ Chargen Bezeichnung	“ Χαρακτηρισμός παρτίδας
	“ Lote	
CE	“ Conformità europea	“ EC Declaration of Conformity
	“ Déclaration CE de Conformité	“ Declaración CE de Conformidad
	“ Europäische Konformität	“ Ευρωπαϊκή συμφωνία
	“ Declaração CE de Conformidade	
	“ 24 determinazioni	“ 24 tests
	“ 24 tests	“ 24 pruebas
	“ 24 Bestimmungen	“ 24 προσδιορισμοί
	“ 24 Testes	
	“ Rispettare le istruzioni per l'uso	“ See instructions for use
	“ Voir les instructions d'utilisation	“ Ver las instrucciones de uso
	“ Gebrauchsanweisung beachten	“ Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	“ Ver as instruções de uso	
	“ Da utilizzarsi entro	“ Use by
	“ Utilise avant le	“ Utilizar antes de
	“ Verwendbar bis	“ Χρήση μέχρι
	“ Utilizar antes de	
	“ Conservare a 2-8°C	“ Store at 2-8°C (35-46°F)
	“ Conserver à 2-8°C	“ Conservar a 2-8°C
	“ Lagerung bei 2-8°C	“ Φυλάσσεται στους 2-8°C
	“ Conservar entre 2-8°C	
	“ Prodotto da	“ Manufactured by
	“ Fabriqué par	“ Fabricado por
	“ Hergestellt von	“ Κατασκευάζεται από
	“ Fabricado por	
STRIP	“ Strip di nitrocellulosa rivestita	“ Coated nitrocellulose strip
	“ Strip de nitrocellulose couché	“ Tira de nitrocelulosa recubierta
	“ Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgetragenen Antigenen	“ Επίστρωση λωρίδα νιτροκυτταρίνης
	“ Tira de nitrocelulose revestido	
WASH 20x	“ Tampone di lavaggio	“ Wash buffer
	“ Tampon de Lavage	“ Solución de lavado
	“ Waschpuffer	“ Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	“ Solução de lavagem	
Block-Reag	“ Reagente bloccante	“ Blocking Reagent
	“ réactif de blocage	“ Reactivo bloqueante
	“ Blockier-Reagenz	“ Αντιδραστήριο αποκλεισμού
	“ Bloqueio de reagente	“
RCNS 10ml	“ Ricostituire con 10 mL	“ Reconstitute with 10 mL
	“ reconstituer avec 10 mL	“ reconstituir con 10 mL
	“ rekonstituieren mit 10 mL	“ Ανασύσταση με 10 mL
	“ reconstituir com 10 mL	“
SB	“ Tampone campione	“ Sample buffer
	“ Tampon Echantillons	“ Tampón Muestras
	“ Probenpuffer	“ Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	“ Diluente de amostra	
CONJ	“ Coniugato	“ Conjugate
	“ Conjugé	“ Conjugado
	“ Konjugat	“ Σύζευγμα
	“ Conjugado	
SUB	“ Tampone substrato	“ Substrate buffer
	“ Substrat	“ Tampón sustrato
	“ Substratpuffer	“ Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	“ Substrato	