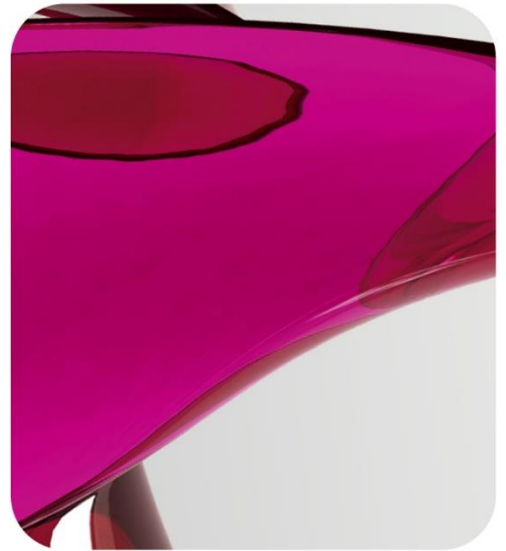
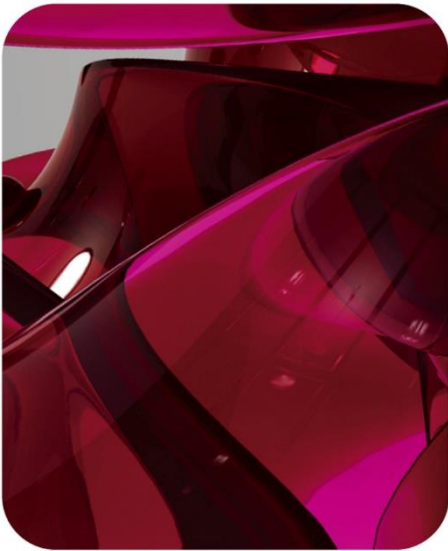




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKUBLOTS[®]
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

INSTRUCTION MANUAL

AESKUBLOTS[®] *Borrelia-G/-M*
Ref 4006 / 4007



Product Ref.	4006/4007
Product Desc.	Borrelia-G/M
Manual Rev. No.	009 : 2018-04-04

Istruzioni per l'uso

Indice dei contenuti

1	Usò previsto.....	1
2	Applicazione clinica e principio del test.....	1
3	Contenuto del kit.....	2
4	Conservazione e stabilità.....	3
5	Precauzioni per l'uso e considerazioni generali.....	3
6	Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni	4
7	Procedura del test.....	4
8	Interpretazione qualitativa	7
9	Dati tecnici	8
10	Performance del test.....	8
11	Bibliografia	9



1 Uso previsto

AESKUBLOTS® Borrelia-G/M è un test immunoenzimatico su membrana sensibile per la rilevazione qualitativa di anticorpi specifici IgG/M diretti contro la *Borrelia burgdorferi* nel siero umano. Gli antigeni sono fissati secondo linee parallele in posizioni ben definite su una membrana di nitrocellulosa.

Il test è uno strumento per confermare la positività dei risultati ottenuti con tecnica ELISA.

2 Applicazione clinica e principio del test

La malattia di Lyme è una malattia multisistemica causata dall'infezione da spirocheta *Borrelia burgdorferi*. Questo patogeno fu scoperto nel 1981 da Willy Burgdorfer (Burgdorfer et al., 1982). Finora la malattia è stata suddivisa in tre fasi cliniche (Fase I: sintomi dell'eritema migrante, Fase II: manifestazioni cliniche precoci dopo disseminazione del patogeno, Fase III: manifestazioni tardive). Questa suddivisione tuttavia è obsoleta, poiché i sintomi delle varie fasi si sovrappongono. Attualmente è possibile distinguere tra una manifestazione precoce e una manifestazione tardiva. La manifestazione precoce corrisponde alle fasi I / II della precedente suddivisione e quella tardiva alla fase III. La manifestazione tardiva comporta gravi sintomi clinici e un trattamento con antibiotici risulta complesso. Per queste ragioni, una diagnosi precoce è di enorme rilevanza.

Il vettore principale della *Borrelia* in Europa è la comune zecca del bosco *Ixodes ricinus*, Genere: *Ixodidae* (zecche). Poiché vivono in zone densamente boschive, la malattia si concentra proprio qui, soprattutto in estate e in autunno. Una volta che la zecca ha terminato il pasto di sangue, i patogeni si moltiplicano nel suo intestino. Successivamente i batteri migrano verso le ghiandole salivari e vengono iniettati nella ferita attraverso la saliva.

La diagnosi della forma precoce si basa sui sintomi clinici dell'eritema migrante. Tuttavia questi sintomi sono assenti nel 20-40% dei soggetti. Inoltre, i sintomi nella fase tardiva sono molto diversificati. I test sierologici sono perciò un fattore rilevante per la diagnosi. Sebbene l'evidenza più certa si ottenga con la coltura dei patogeni prelevati dal sangue, dal liquor cerebrospinale o da una biopsia cutanea, questa metodologia non è utilizzabile per una diagnostica di routine a causa della sua lunga durata e della sua scarsa sensibilità. In assenza di un gold standard per la diagnosi della borreliosi, la Società Tedesca di Igiene e Microbiologia (DGHM) consiglia attualmente di effettuare una procedura diagnostica ripartita in due fasi (Borreliosi di Lyme MIQ), partendo da un accertamento diagnostico iniziale (solitamente con tecnica ELISA), seguito da un ulteriore test di conferma (1), quale ad esempio l'immunofissazione (western blot), nel caso di un esito ELISA positivo o dubbio.

Antigeni impiegati:

Nomenclatura degli antigeni borrelia	Proprietà delle proteine	Digitare	origine
p100	Proteina di membrana associata alle vescicole	rec	<i>B. afzelii</i>
VlsE	variable major protein-like sequence Expressed	rec	<i>B. afzelii</i>
p58	non caratterizzato	rec	<i>B. garinii</i>
p41 (Flagellin)	proteina strutturale degli endoflagelli	rec	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>
p39 (BmpA)	Flagella complex Borrelia membrane protein A	rec	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i>
p31 (OspA)	Outer surface, protein A	rec	<i>B. afzelii</i>

Nomenclatura degli antigeni borrelia	Proprietà delle proteine	Digitare	origine
p23 (OspC)	Outer surface protein C, mix di diversi sottotipi di borrelia	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. bavariensis, B. afzelii, B. spielmanii
p18 (DbpA)	Decorin binding protein A	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, B. spielmanii, B. bavariensis

Principio del test

Gli antigeni sono fissati, in linee parallele, su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stabilizzata per evitare reazioni aspecifiche. Le strisce di membrana con gli specifici antigeni, fissati in posizioni ben definite, vengono incubate in campioni di siero diluiti con un rapporto di 1:101. Gli anticorpi del soggetto, se presenti nel campione, si legano con l'antigene. La frazione non legata viene eliminata tramite lavaggio nella fase seguente. Successivamente le immunoglobuline anti-umane, coniugate con perossidasi di rafano (coniugata), vengono incubate e reagiscono con il complesso anticorpo-antigene dei campioni. Il coniugato non legato viene eliminato tramite lavaggio nella fase seguente. L'aggiunta del substrato TMB provoca una reazione enzimatica che lo converte in un precipitato di colore blu. La reazione viene bloccata con acqua distillata.

3 Contenuto del kit

DA RICOSTITUIRE PRIMA DELL'USO				
Componente	Quantità	Colore del tappo	Colore della soluzione	Descrizione / Contenuto
Tampone di lavaggio e tampone campione (5x)	2x 100 ml	bianco	incolore	5 volte concentrato per la preparazione di 1 litro
PRONTO ALL'USO				
Componente	Quantità	Colore del tappo	Colore della soluzione	Descrizione / Contenuto
IgG, coniugato (Ref 4006)	1 x 10 ml	blu	porpora	Contenente: immunoglobulina G anti-umana (IgG) coniugata con perossidasi di rafano
IgM, coniugato (Ref 4007)	1 x 10 ml	verde	verde	Contenente: immunoglobulina M anti-umana (IgM) coniugata con perossidasi di rafano
Substrato TMB	1 x 10 ml	nero	incolore	TMB stabilizzato /H ₂ O ₂
Strip di membrana	24 strip	codice colore: verde	Nds	Per gli antigeni rivestiti si rimanda all'Applicazione clinica e al Principio del test
vaschetta d'incubazione	3 pezzi	Nds	Nds	Nds
pinzette, modello di riferimento, tabella di valutazione	1 pezzo ciascuno	Nds	Nds	Nds
MATERIALE OCCORRENTE, MA NON FORNITO NEL KIT				
piastra oscillante, bombola da 1000 ml, pipetta o bombola da 10 ml, pipette di precisione (10, 1000 µl), carta assorbente o filtrante. I nostri test sono concepiti per essere eseguiti con acqua depurata, conformemente alle disposizioni della Farmacopea degli Stati Uniti (USP 26 - NF 21) e della Farmacopea Europea (Eur.Ph. 4a ed.).				

4 Conservazione e stabilità

Conservare tutti i reagenti e le strip di membrana ad una temperatura di 2÷8 °C/35÷46°F nei rispettivi contenitori originali. Una volta preparate, le soluzioni ricostituite sono stabili a 2-8°C/35-46°F per almeno quattro settimane. Reagenti e strip devono essere utilizzati entro la data di scadenza indicata sulla confezione. Non utilizzare i componenti dopo la data di scadenza indicata. Evitare di esporre la soluzione TMB a fonti di luce intensa.

5 Precauzioni per l'uso e considerazioni generali

5.1 Dati sulla sicurezza

Questo prodotto è per esclusivo uso DIAGNOSTICO IN VITRO. Pertanto, il kit è destinato esclusivamente a personale di laboratorio altamente qualificato e specializzato in metodologie di diagnostica in vitro. Sebbene questo prodotto non sia considerato particolarmente tossico o pericoloso nelle normali condizioni d'uso previsto, occorre attenersi a quanto segue per operare in massima sicurezza:

Avvertenze e precauzioni

Questo kit contiene componenti potenzialmente pericolosi. Sebbene i reagenti contenuti nel kit non siano classificati come irritanti per gli occhi e la cute, si raccomanda di evitare qualsiasi contatto con occhi e cute e di indossare guanti monouso.

Il tampone di lavaggio, il coniugato e il substrato contengono caton (1% v/v) come conservante. Non devono essere ingeriti o venire a contatto con la cute o le mucose.

Quando si utilizza il kit si raccomanda di non fumare, di non mangiare e di non bere. Non pipettare con la bocca.

Trattare i campioni clinici come potenzialmente infetti, quindi nel totale rispetto delle normative nazionali vigenti.

5.2 Indicazioni generali per l'uso

Un codice colore, posizionato sopra la linea di riferimento delle strip, contraddistingue i vari test **AESKUBLOTS®** disponibili:

Codice colore	AESKUBLOTS®
rosso	ANA-17 Comp
arancione	ANA-17 Pro
blu	Myositis Pro
marrone	Liver Pro
porpora	Vasculitis Pro
nero	Gastro Pro
verde	Borrelia-G e Borrelia-M

Se le informazioni contenute sul prodotto, etichette incluse, risultassero inesatte, contattare il produttore o il fornitore del kit.

Il tampone di lavaggio e il tampone campione sono interscambiabili tra lotti di kit differenti. Tutti gli altri componenti si intendono specifici di ogni singolo kit e pertanto non sono interscambiabili. Non si devono scambiare le componenti tra test di autoimmunità e diagnostica per Borrelia!

Product Ref.	4006/4007
Product Desc.	Borrelia-G/-M
Manual Rev. No.	009 : 2018-04-04

Prima dell'uso portare tutti i componenti a temperatura ambiente (20-32°C/68-89,6°F), miscelare bene e seguire lo schema di incubazione prescritto per una performance ottimale del test.

Non esporre mai i componenti ad una temperatura superiore a 37°C/ 98,6°F.

Pipettare la soluzione del substrato sempre ed esclusivamente con puntali nuovi. Proteggere questo reagente da fonti luminose. Non pipettare mai il coniugato con puntali utilizzati precedentemente per altri reagenti.

L'intensità del colore di banda non è necessariamente correlata ai titoli di un anticorpo rilevati con altre metodologie di riferimento.

Campioni provenienti da donatori di sangue apparentemente sani possono contenere autoanticorpi.

Se il campione clinico contiene livelli elevati di complessi immuni o di altri aggregati di immunoglobuline, non sarà possibile escludere risultati falso positivi per mezzo di un legante non-specifico.

Una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati del test condotto, che dovrebbe essere richiesto dal medico solo dopo aver valutato tutte le analisi cliniche e di laboratorio. La diagnosi deve essere verificata utilizzando metodologie diagnostiche differenti.

6 Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni

Utilizzare preferibilmente campioni di siero freschi. Il prelievo di sangue deve essere effettuato secondo le normative nazionali vigenti. Non utilizzare campioni itterici, lipemici, emolizzati o contaminati da batteri. Sieri contenenti particelle devono essere separati, utilizzando una centrifuga a bassa velocità (<1000 giri). I campioni di sangue devono essere raccolti in provette pulite, asciutte e vuote.

Dopo la separazione, i campioni di siero devono essere utilizzati entro le 8 ore successive. In caso contrario, possono essere conservati in flaconi a chiusura ermetica a 2-8°C/35-46°F per un massimo di 48 ore, oppure congelati a -20°C/-4°F per periodi più lunghi. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Non utilizzare campioni riscaldati perciò inattivati. (Thomas: Labor und Diagnose; CLSI Guideline GP44-A4 Vol. 30 No. 10).

7 Procedura del test

7.1 Preparazione preliminare

Diluire il tampone di lavaggio concentrato 1 + 4 con acqua distillata (ad es. 20 ml + 80 ml).

7.2 Fasi del test

7.2.1 Procedura manuale

Indicazioni importanti:

Seguire esattamente questo protocollo. Assicurarsi che i due componenti citati nel protocollo vengono aggiunti al vassoio in fasi 6, 9.

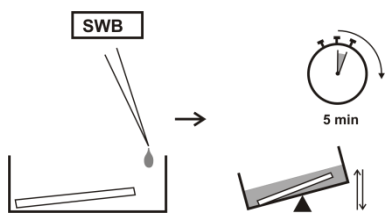
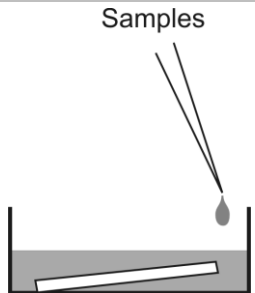
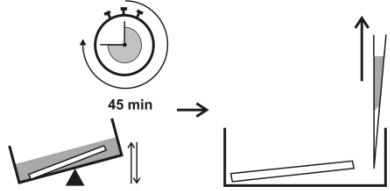
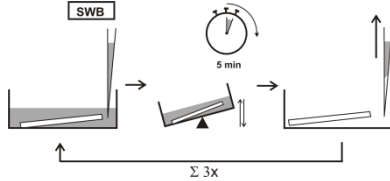
Evitare che la strip si asciughi durante le fasi di incubazione.

Non afferrare la strip con le dita, utilizzare le pinzette.

Rimuovere i campioni diluiti subito dopo l'incubazione, per evitare il prolungarsi dell'azione.

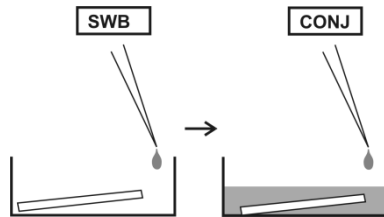
Agitare costantemente la strip durante le fasi di incubazione.

Collocare il tampone campione, il coniugato e il substrato unitamente con il tampone di lavaggio su un lato della vaschetta d'incubazione. Non contaminare la striscia.

Fase	Descrizione
1.	Prima di iniziare il test assicurarsi che le preparazioni, dalla fase 7.1 descritta sopra, siano state eseguite.
2.	 <p>Posizionare correttamente la strip nella vaschetta d'incubazione (linea di riferimento e codice colore rivolti verso l'alto). Inumidire la strip con 1 ml di tampone di lavaggio e tampone campione e incubare per 5 minuti agitando bene.</p>
CONTROLLI E CAMPIONI	
3.	 <p>Pipettare 10 µl di campione di siero nei pozzetti predisposti della vaschetta d'incubazione con il tampone campione.</p>
4.	 <p>Incubare per 45 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene. Dopodiché rimuovere completamente il campione.</p>
5.	 <p>Lavare 3 volte per 5 minuti con 1,5 ml di tampone di lavaggio, agitando bene. Rimuovere il tampone di lavaggio dopo ogni fase di lavaggio.</p>

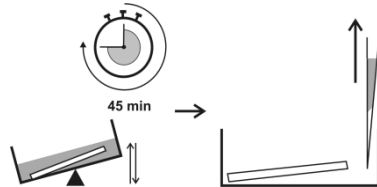
CONIUGATO

6.



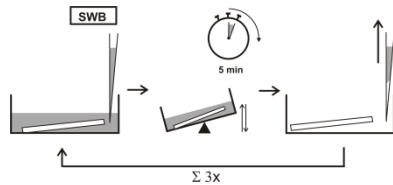
Pipettare 700 µl di tampone di lavaggio e 300 µl di coniugato in ogni vaschetta d'incubazione con la strip.

7.



Incubare per 45 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene. Rimuovere il coniugato.

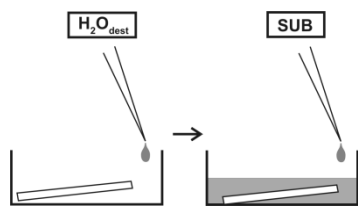
8.



Lavare 3 volte per 5 minuti con 1,5 ml di tampone di lavaggio, agitando bene. Rimuovere il tampone di lavaggio dopo ogni fase di lavaggio.

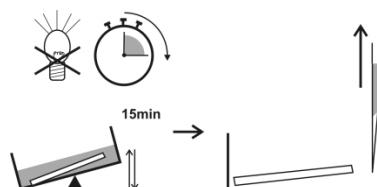
SUBSTRATO

9.



Pipettare 700 µl di dH₂O e 300 µl di substrato in ogni vaschetta d'incubazione con la strip.

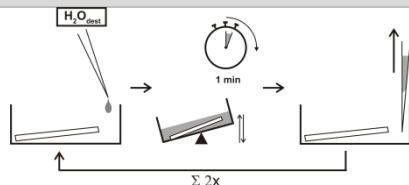
10.



Incubare per 15 minuti a 20-32°C/68-89,6°F, agitando bene, al riparo da fonti luminose intense. Rimuovere il substrato.

STOP

11.



Pipettare 2 ml di dH₂O in ogni vaschetta d'incubazione con la strip. Incubare per 1 minuto, agitando bene. Rimuovere dH₂O. Replicare una volta.

12.

Rimuovere la strip dalla vaschetta d'incubazione. Asciugare la strip con carta assorbente

13.

Interpretare la strip asciutta entro 6 ore.

8 Interpretazione qualitativa

8.1 Analisi manuale

Su ogni strip di test **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M** vi sono diverse bande di controllo.

- 1) Due controllo funzionalenella parte superiore e inferiore della striscia (reazione altamente positiva con ogni campione di siero)
- 2) Controlli del coniugato IgG e IgM (reazione altamente positiva con il coniugato corrispondente. A seconda del siero utilizzato, l'altro controllo del coniugato può sviluppare un colore tenue non specifico).
- 3) Controllo cut-off, la cui intensità è utilizzata per la valutazione dei risultati delle bande diagnostiche.

I risultati del test possono considerarsi validi se:

- i controlli funzione sono visibili
- è visibile un controllo cut-off
- il controllo del coniugato corrispondente è diventato visibile

Incollare la strip asciutta sulla tabella di valutazione, allineandola alla linea di riferimento (membrana autoadesivo). Allineare il modello di riferimento alla linea di riferimento della strip. Interpretare i risultati facendo riferimento esclusivamente al controllo cut-off di ciascuna strip.

Interpretazione **AESKUBLOTS® Borrelia-G**

Interpretazione	IgG
negativo	1 banda tranne VIsE > cut
livello borderline	VIsE o 1 banda + p41 \geq cut
positivo	2 bande tranne p41 \geq cut

Interpretazione **AESKUBLOTS® Borrelia-M**

Interpretazione	IgM
negativo	Nessuna banda senza p41 > cut
livello borderline	1 banda tranne OspC o p41 o p18 \geq cut
positivo	OspC o p18 o 2 altre bande \geq cut

I risultati possono essere registrati sulla tabella di valutazione.

Nel caso in cui i valori dei controlli non corrispondano ai criteri stabiliti il test non è valido e deve essere ripetuto.

Verificare inoltre le seguenti problematiche tecniche: data di scadenza dei reagenti (preparati), condizioni di conservazione, pipette, attrezzatura, condizioni di incubazione e metodi di lavaggio.

Se i campioni testati evidenziano valori aberranti o anomalie di qualsiasi tipo, oppure i criteri di validazione non vengono raggiunti per ragioni non imputabili alla responsabilità dell'operatore, contattare il produttore o il fornitore del kit.

I laboratori medici possono eseguire un controllo qualità interno utilizzando metodologie proprie e/o sieri coltivati internamente, secondo quanto stabilito dalle normative nazionali vigenti.

9 Dati tecnici

Materiale del campione:	siero
Volume del campione:	10 µl di campione
Tempo di incubazione complessivo:	142 minuti a 20-32°C/68-89,6°F
Conservazione:	a 2-8°C/35-46°F; utilizzare esclusivamente flaconi originali.
Numero di determinazioni:	24 test

10 Performance del test

10.1 Sensibilità e specificità relativa

Nell'ambito di uno studio comparativo, sono stati esaminati 80 sieri di pazienti con sospetta borreliosi con **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M** ed un altro line immunoassay commerciale.

n = 80		Line immunoassay a confronto	
		positivi	negativi
AESKUBLOTS® Borrelia-G/M	positivi	52	7
	negativi	2	19

È stata rilevata una concordanza positiva (sensibilità relativa) del 96,2 %.

I sieri con risultati discordanti rispetto al test comparativo sono stati sottoposti ad un ulteriore test con metodo blot. I risultati ottenuti da tale test erano in linea con **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

È anche stato svolto uno studio comparativo su 32 sieri di pazienti con sospetta infezione recente da Borrelia con **AESKUBLOTS® Borrelia-M** ed un altro line immunoassay commerciale.

n = 32		Line immunoassay IgM a confronto	
		positivi	negativi
AESKUBLOTS® Borrelia- M	positivi	9	3
	negativi	1	19

È stata rilevata una concordanza positiva (sensibilità relativa) del 90 %.

I sieri con risultati discordanti rispetto al test comparativo sono stati sottoposti ad un ulteriore test con metodo blot. È stato possibile confermare due dei tre sieri positivi e il siero negativo.

Per la determinazione della concordanza negativa (specificità relativa) sono stati esaminati 400 donatori di sangue con **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

Product Ref.	4006/4007
Product Desc.	Borrelia-G/-M
Manual Rev. No.	009 : 2018-04-04

La prova di conferma delle IgG con AESKUBLOTS® Borrelia-G ha determinato 35 positivi, corrispondenti al **91,3%**.

La prova di conferma delle IgM con AESKUBLOTS® Borrelia-M ha determinato 11 positivi, corrispondenti al **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.

Per maggiori informazioni:




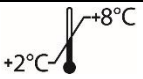

Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC (1995). Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol. 33:419–27.

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 nitrocellulosa recubierta
	" Nitrozellulosemembran-Streifen mit aufgebracht Antigenen	" Επιστρώση λωρίδα νιτροκυταρίνης
	" Tira de nitrocellulose 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	