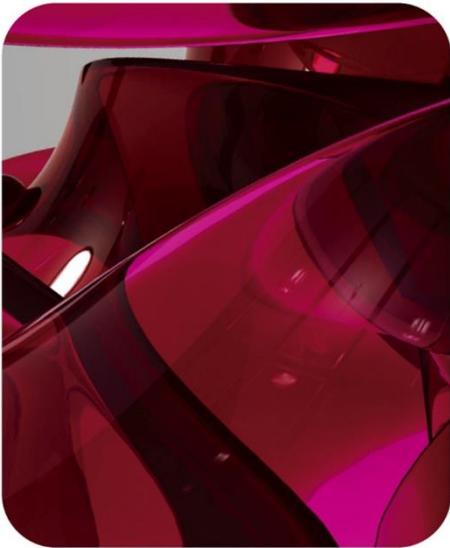




AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



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

Manual de instrucciones

Tabla de contenidos

1	Utilización	1
2	Aplicaciones clínicas y principio del análisis.....	1
3	Contenido del kit	2
4	Almacenamiento y caducidad	3
5	Precauciones de uso e instrucciones generales	3
6	Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras	4
7	Procedimiento del ensayo.....	5
8	Interpretación cualitativa	7
9	Datos técnicos	8
10	Datos de funcionamiento	8
11	Bibliografía.....	9



1 Utilización

AESKUBLOTS® Borrelia-G/M es un enzimoimmunoensayo de membrana sensibles para la detección cualitativa de anticuerpos IgG/M específicos frente a la bacteria *Borrelia burgdorferi* en suero humano. Los antígenos se sitúan en forma de líneas paralelas en posiciones exactamente definidas sobre la membrana de nitrocelulosa. El ensayo se utiliza para confirmar resultados ELISA positivos.

2 Aplicaciones clínicas y principio del análisis

La enfermedad de Lyme es una enfermedad multisistémica causada por la infección con la bacteria *Borrelia burgdorferi* de la clase Spirochaetes. Este patógeno fue descubierto en 1981 por Willy Burgdorfer (Burgdorfer et al., 1982). Hasta el momento se han identificado tres etapas en la enfermedad (etapa I: eritema migratorio como síntoma, etapa II: primeras manifestaciones clínicas después de la diseminación del patógeno, etapa III: manifestaciones tardías). Sin embargo, esta clasificación ha quedado obsoleta debido a que los síntomas de las diferentes etapas se superponen. En la actualidad, se puede distinguir una manifestación temprana y una manifestación tardía de la enfermedad. La fase temprana corresponde a las etapas I/II de la clasificación anterior y la fase tardía, a la etapa III. El inicio tardío puede tener síntomas clínicos graves y su tratamiento con antibióticos presenta dificultades. Por estos motivos, un diagnóstico temprano es de gran importancia.

El principal vector de la bacteria *Borrelia* en Europa es la garrapata común *Ixodes ricinus*, del género: Ixodidae (garrapatas). La enfermedad aparece en áreas muy arboladas donde abundan este tipo de garrapatas, especialmente en verano y otoño. Una vez que la garrapata ha absorbido la sangre, los patógenos se multiplican en su intestino medio. Posteriormente, las bacterias migran a la glándula salival y se inyectan con la saliva en la herida.

El diagnóstico de la forma temprana se basa en el síntoma clínico del eritema migratorio. Sin embargo, el 20-40% de los pacientes no presentan este síntoma. Asimismo, los síntomas de las fases posteriores son muy diversos. Los análisis serológicos son, por lo tanto, un importante factor en el diagnóstico. Aunque la evidencia más segura es el cultivo de patógenos procedentes de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo o biopsia cutánea, este análisis no se ha aprobado para el diagnóstico rutinario debido a su larga duración y baja sensibilidad. Debido a la falta de una prueba de referencia para el diagnóstico de la borreliosis (enfermedad de Lyme), en la actualidad la Sociedad Alemana para Higiene y Microbiología (DGHM) recomienda un procedimiento de análisis de dos fases (MIQ Lyme Borreliosis), que requiere una evaluación de diagnóstico inicial (normalmente ELISA), seguida de una confirmación de un resultado positivo o dudoso de ELISA mediante una prueba adicional (1), como un análisis de inmunotransferencia.

Antígenos utilizados:

Nombres de los antígenos de <i>Borrelia</i>	Propiedades de las proteínas	tipo	origen
p100	Proteína de las vesículas membranosas	rec	<i>B. afzelii</i>
VlsE	Secuencia proteínica mayor variable expresada	rec	<i>B. afzelii</i>
p58	no caracterizada	rec	<i>B. garinii</i>
p41 (flagelina)	Proteína estructural de la endoflagelina	rec	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>
p39 (BmpA)	Proteína de membrana A de <i>Borrelia</i> , complejo de flagelos	rec	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i>

Nombres de los antígenos de Borrelia	Propiedades de las proteínas	tipo	origen
p31 (OspA)	Proteína A de la superficie externa	rec	B. afzelii
p23 (OspC)	Proteína C de la superficie externa, mezcla de diferentes subtipos de borrelia	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. bavariensis, B. afzelii, B. spielmanii
p18 (DbpA)	Proteína de unión de decorina A	rec	B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, B. spielmanii, B. bavariensis

Principio del análisis

Los antígenos se aplican en forma de líneas sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloquea para impedir reacciones no específicas. Las tiras de membrana con antígenos específicos se incuban en posiciones exactamente definidas en muestras de suero diluidas en una proporción de 1:101. Los anticuerpos del paciente, si están presentes en la muestra, se unen al antígeno. La fracción no unida es eliminada por lavado en el paso siguiente. Después se incuban inmunoglobulinas anti-humanas conjugadas con peroxidasa de rábano picante (conjugado), que reaccionan con el complejo antígeno-anticuerpo de las muestras. El conjugado no unido se elimina por lavado en el paso siguiente. Tras la adición del sustrato TMB, una reacción enzimática convierte el conjugado en un precipitado azul. La reacción se detiene con agua destilada.

3 Contenido del kit

SE DEBE RECONSTITUIR				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Tampón para muestra y lavado (5x)	2x 100 ml	blanco	incolore	Concentrado 5 veces para preparación de 1 l
LISTO PARA EL USO				
Artículo	Cantidad	Color del tapón	Color de la solución	Descripción/Contenido
Conjugado, IgG (Ref 4006)	1 x 10 ml	azul	púrpura	Inmunoglobulina anti-humana G (IgG) conjugada con peroxidasa de rábano picante
Conjugado, IgM (Ref 4007)	1 x 10 ml	verde	verde	Contiene: Inmunoglobulina anti-humana M (IgM) conjugada con peroxidasa de rábano picante
Sustrato TMB	1 x 10 ml	negro	incolore	TMB/H ₂ O ₂ estabilizada
Tiras de membrana	24 tiras	Codificación por colores: Verde	N/A	Antígenos recubiertos, véase Aplicaciones clínicas y principio del análisis
bandeja de incubadora	3 por cada kit	N/A	N/A	N/A
Pinzas, plantilla de referencia, hoja de resultados	1 por cada kit	N/A	N/A	N/A
MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO				
Plataforma de agitación, cilindro para 1000 ml, cilindro o pipeta para 10 ml, pipetas de precisión (10, 1000 µl), papel de filtro o absorbente. Nuestras pruebas se han diseñado para usarse con agua destilada, de acuerdo con la definición de las farmacopeas de Estados Unidos (USP 26 - NF 21) y Europa (Eur.Ph. 4. ^a ed.).				

4 Almacenamiento y caducidad

Mantenga todos los reactivos y tiras de membrana a 2-8 °C/35-46 °F en sus recipientes originales. Una vez preparadas, las soluciones de reconstitución serán estables a 2-8 °C/35-46 °F durante al menos cuatro semanas. Los reactivos y las tiras deberán utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada en cada componente. No utilice los componentes una vez superada la fecha de caducidad. Evite la exposición intensa a la luz de la solución TMB.

5 Precauciones de uso e instrucciones generales

5.1 Datos de riesgo para la salud

Este producto se ha diseñado exclusivamente para DIAGNÓSTICO IN VITRO. Como consecuencia, el kit sólo puede ser utilizado por personal con la cualificación apropiada y formación especial sobre los métodos de diagnóstico in vitro. Aunque este producto no se considera especialmente tóxico ni peligroso en las condiciones de uso previsto, siga estas recomendaciones para garantizar un nivel de seguridad óptimo:

Recomendaciones y precauciones

Este kit incluye componentes potencialmente peligrosos. Aunque los reactivos del kit no están clasificados como irritantes para los ojos o la piel, se recomienda evitar el contacto con los ojos y la piel, y llevar guantes desechables.

Tanto el tampón de lavado como el conjugado y el sustrato contienen kathon (1% v/v) como conservante. No se deben ingerir ni permitir que entren en contacto con la piel ni la membrana mucosa.

Está prohibido fumar, comer y beber mientras se manipula el kit. La pipeta no se debe llevar a la boca.

Manipule las muestras del paciente como si existiera riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y siguiendo los requisitos de su país.

5.2 Instrucciones generales de uso

A fin de diferenciar los distintos análisis **AESKUBLOTS®** disponibles, se aplica una codificación por colores encima de la línea de referencia de las tiras:

Codificación por colores	AESKUBLOTS®
Rojo	ANA-17 Comp
Naranja	ANA-17 Pro
Azul	Myositis Pro
Marrón	Liver Pro
Púrpura	Vasculitis Pro
Negro	Gastro Pro
Verde	Borrelia-G y Borrelia-M

En caso de que observe datos incorrectos en la información del producto, incluidas las etiquetas, póngase en contacto con el fabricante o proveedor del producto.

Los tampones para lavado y muestra se pueden intercambiar entre lotes y kits de análisis. Los componentes restantes son específicos de cada kit de análisis y no se deben intercambiar. No intercambiar los componentes de los reactivos entre los kits de autoinmunidad y borrelia.

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

Permita que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente (20-32 °C/68-89,6 °F) antes de utilizarlos, mézclelos bien y siga el esquema de incubación recomendado para conseguir un rendimiento óptimo.

No exponga nunca los componentes a temperaturas superiores a los 37 °C/98,6 °F.

Pipetee siempre la solución de sustrato con puntas completamente nuevas. Proteja el reactivo de la luz. No pipetee nunca el conjugado con puntas utilizadas anteriormente con otros reactivos.

La intensidad del color de banda no está necesariamente correlacionada con los títulos de anticuerpos obtenidos mediante otras metodologías de referencia.

Las muestras obtenidas de donantes de sangre aparentemente sanos pueden contener autoanticuerpos.

Si la muestra del paciente contiene niveles elevados de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulina, no se podrán descartar falsos positivos provocados por uniones no específicas.

El diagnóstico clínico definitivo no debería fundamentarse únicamente en los resultados de la prueba realizada, sino que debería llevarlo a cabo el médico una vez evaluados todos los datos clínicos y analíticos. El diagnóstico debe verificarse utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

6 Obtención, manipulación y almacenamiento de las muestras

Deben utilizarse preferentemente muestras de suero recién extraídas. La extracción de sangre debe cumplir los requisitos de protocolo de su país. No deben utilizarse muestras ictéricas, lipémicas, hemolizadas ni contaminadas con bacterias. Las muestras de suero con partículas se deben limpiar mediante centrifugación a baja velocidad (<1000 x g). Las muestras de sangre deben recogerse en tubos limpios, secos y vacíos.

Tras la separación, las muestras de suero han de utilizarse durante las primeras 8 horas. Como alternativa, las muestras deberían conservarse en viales herméticamente cerrados a 2-8 °C/35-46 °F durante un máximo de 48 horas o congelados a -20 °C/-4 °F durante periodos más prolongados. Evite congelar y descongelar las muestras repetidas veces. No utilice muestras inactivadas térmicamente. (Thomas: Labor und Diagnose; CLSI Guideline GP44-A4 Vol. 30 No. 10).

7 Procedimiento del ensayo

7.1 Preparativos antes de comenzar

Diluya la solución concentrada de tampón de lavado a 1:4 con agua destilada (por ejemplo, 20 ml con 80 ml)..

7.2 Pasos del análisis

Notas importantes:

Siga exactamente este protocolo. Asegúrese de que los dos componentes mencionados en el protocolo se añaden a la bandeja en los pasos 6, 9.

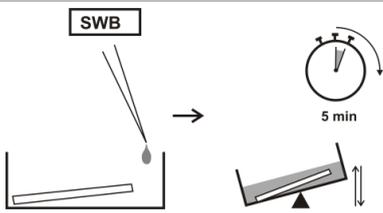
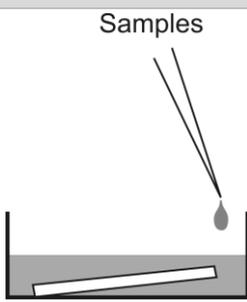
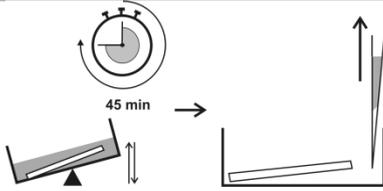
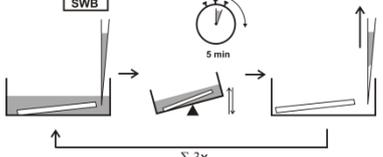
No permita que la tira se seque durante los pasos de incubación.

No toque la tira con los dedos; use las pinzas.

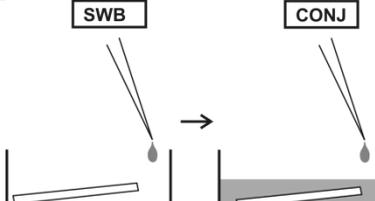
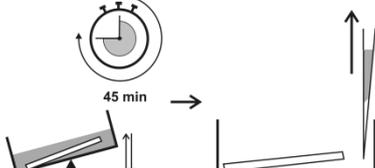
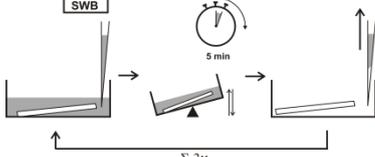
Retire por completo las muestras diluidas tras la incubación de la tira a fin de evitar su arrastre.

Agite continuamente la tira durante los pasos de incubación.

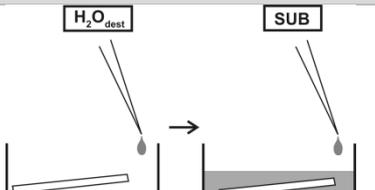
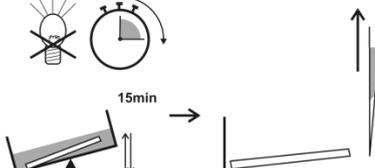
Vierta el tampón para muestra, el conjugado y el sustrato junto con el tampón de lavado en un lado de la bandeja de incubación. No permita que fluya sobre la tira.

Paso	Descripción
1.	Asegúrese de que los preparativos del paso 7.1 (arriba) se han llevado a cabo antes del comienzo del análisis.
2.	 <p>Sitúe la tira en la orientación correcta dentro de la bandeja de incubación (línea de referencia y codificación por color hacia arriba). Humedezca la tira con 1 ml de tampón para muestra y lavado e incube durante 5 minutos con agitación.</p>
CONTROLES y MUESTRAS	
3.	 <p>Pipetee 10 µl de muestra de suero en el interior de las bandejas de incubación designadas con tampón para muestra.</p>
4.	 <p>Incube durante 45 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación. A continuación, retire la muestra por completo.</p>
5.	 <p>Lave tres veces durante 5 minutos con 1,5 ml de tampón de lavado y agitación. Retire el tampón de lavado después de cada paso de lavado.</p> <p style="text-align: center;">Σ 3x</p>

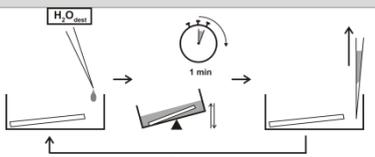
CONJUGADO

6.		<p>Pipetee 700 µl de tampón de lavado y 300 µl de conjugado en cada bandeja de incubación con tira.</p>
7.		<p>Incube durante 45 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación. Retire el conjugado.</p>
8.		<p>Lave tres veces durante 5 minutos con 1,5 ml de tampón de lavado y agitación. Retire el tampón de lavado después de cada paso de lavado.</p>

SUSTRATO

9.		<p>Pipetee 700 µl de dH₂O y 300 µl de sustrato en cada bandeja de incubación con tira.</p>
10.		<p>Incube durante 15 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F con agitación y evite que reciba luz intensa. Retire el sustrato.</p>

PARO

11.		<p>Pipetee 2 ml de dH₂O en cada bandeja de incubación con tira. Incube durante 1 minuto con agitación. Retire el dH₂O. Repita este paso.</p>
12.	<p>Retire la tira de la bandeja de incubación. Seque la tira con papel de filtro.</p>	
13.	<p>Interprete los resultados de la tira seca en un plazo de 6 horas.</p>	

8 Interpretación cualitativa

Análisis manual

Cada tira de prueba **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M** incluye varias bandas para control.

- 1) Banda para control de función en la parte superior y en la parte inferior de la tira (reacción positiva de gran intensidad con cada muestra de suero)
- 2) Controles de conjugado IgG e IgM (reacción positiva de gran intensidad con el conjugado correspondiente; según el suero utilizado, es posible que el otro control de conjugado desarrolle un color débil, no específico)
- 3) Control de cut-off cuya intensidad se utiliza para la evaluación de resultados de las bandas de diagnóstico

Los resultados del análisis se pueden considerar válidos si:

- Los controles funcionales son visibles.
- El control de cut-off es visible.
- Y el control de conjugado correspondiente se hace visible.

Fije la tira seca a la hoja de resultados alineada con la línea de referencia (membrana autoadesivo). Alinee la plantilla de referencia con la línea de referencia de la tira. Interprete los resultados tomando como referencia exclusivamente el control de cut-off de cada tira.

Interpretación **AESKUBLOTS® Borrelia-G:**

Interpretación	IgG
negativo	1 banda excepto VIsE > Cut-off
límite	VIsE o 1 banda + p41 ≥ Cut-off
positivo	2 bandas excepto p41 ≥ Cut-off

Interpretación **AESKUBLOTS® Borrelia-M:**

Interpretación	IgM
negativo	Ninguna banda excepto p41 > Cut-off
límite	1 banda excepto OspC o p41 o p18 ≥ Cut-off
positivo	OspC o p18 u otras 2 bandas ≥ Cut-off

Los resultados se pueden registrar en la hoja de resultados.

En caso de que los valores de los controles no se ajusten a los criterios, el análisis se considerará no válido y deberá repetirse.

Será necesario comprobar los siguientes problemas técnicos: fechas de caducidad de los reactivos (preparados), condiciones de almacenamiento, pipetas, equipo, condiciones de incubación y métodos de lavado.

Si al analizar las muestras se obtuvieron valores anómalos, se produjo algún tipo de desviación o los criterios de validación no se cumplieron por motivos fuera de la responsabilidad del técnico, póngase en contacto con el fabricante o el proveedor del producto.

Los laboratorios médicos deberían realizar un control de la calidad interno mediante controles propios y/o una mezcla de sueros interna, tal y como contemplan las normativas de su país.

9 Datos técnicos

Material de muestra:	suero
Volumen de muestra:	10 µl de muestra
Tiempo total de incubación:	142 minutos a 20-32 °C/68-89,6 °F
Almacenamiento:	a 2-8 °C/35-46 °F; use exclusivamente los viales originales.
Número de determinaciones:	24 análisis

10 Datos de funcionamiento

Sensibilidad y especificidad relativa

En un estudio comparativo, se analizaron 80 sueros de pacientes con sospecha de borreliosis por medio de las pruebas **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M** y de otro inmunoensayo lineal (LIA) disponible comercialmente.

n = 80		Inmunoensayo lineal (LIA) comparativo	
		positivo	negativo
AESKUBLOTS® Borrelia-G/M	positivo	52	7
	negativo	2	19

Se calculó una coincidencia positiva (sensibilidad relativa) del 96,2%.

Los sueros con resultados diferentes a los del test comparativo se sometieron adicionalmente a otro análisis sanguíneo. En este análisis, se obtuvieron resultados coincidentes con los de las pruebas de **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

Asimismo, en un estudio comparativo, se analizaron 32 sueros de pacientes con sospecha de infección reciente de borreliosis por medio de la prueba **AESKUBLOTS® Borrelia-M** y de otro inmunoensayo lineal (LIA) disponible comercialmente.

n = 32		Inmunoensayo lineal (LIA) IgM comparativo	
		positivo	negativo
AESKUBLOTS® Borrelia- M	positivo	9	3
	negativo	1	19

Se obtuvo una coincidencia positiva (sensibilidad relativa) del 90%.

Los sueros con resultados diferentes a los del test comparativo se sometieron adicionalmente a otro análisis sanguíneo. Con esto, pudieron confirmarse dos de los tres



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

sueros cuyo resultado había sido positivo, así como el suero que obtuvo un resultado negativo.

Para determinar la coincidencia negativa (especificidad relativa) se analizó a 400 donantes de sangre por medio de las pruebas **AESKUBLOTS® Borrelia-G/M**.

35 obtuvieron un resultado positivo en la prueba de IgG con Aeskublots® Borrelia-G, lo que se corresponde con un **91,3%**.

11 obtuvieron un resultado positivo en la prueba de IgM con Aeskublots® Borrelia-M, lo que se corresponde con un **97,3%**.

11 Bibliografía

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

Para leer más:

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	" Επιστρωση 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	