

EU Lyme + VlsE IgG EIA Test System

EU Lyme + VlsE IgG Enzyme Immunoassay (EIA) Test System for the detection of IgG antibodies to *Borrelia afzelii*(PKO), *Borrelia garinii*(G2) and *Borrelia burgdorferi*(B31) including the VlsE Protein

Product # 44-8696G

96 Determinations

Store Kit at +2 to +8° C

INTENDED USE

The Trinity Biotech EU Lyme + VlsE IgG Enzyme Immunoassay (EIA) Test System is a qualitative test intended for use in the presumptive detection of human IgG antibodies to *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi*(B-31) including the VlsE Protein in human serum. This EIA system should be used to test serum from patients with a history and symptoms of infection with *Borrelia*. All positive and equivocal specimens should be re-tested with a highly specific, second-tier test such as Western blot. Positive second-tier results are supportive evidence of infection with *Borrelia*. The diagnosis of Lyme disease should be made based on history and symptoms (such as erythema migrans), and other laboratory data, in addition to the presence of antibodies to *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *B. burgdorferi*(B-31) including the VlsE protein. Negative results (either first or second-tier) should not be used to exclude Lyme disease.

I. SUMMARY

Lyme disease is a multisystem disease caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* (1). The disease has been documented in Europe since early this century. It was documented in the United States during an epidemic in 1975 among children in Old Lyme Connecticut who demonstrated arthritic symptoms. Steere, et al. recognized the disease as a unique clinical entity (2,3). The symptoms of Lyme disease have been mistaken with many diseases including: juvenile rheumatoid arthritis, lupus erythematosus, multiple sclerosis, Bell's palsy, rheumatic fever, Reiter's Syndrome, myocarditis and viral meningitis (4). The predominant strains present in Europe are *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi*.

The spirochete is transmitted by ticks of the genus *Ixodes* from animal reservoirs such as deer, mice, dogs, horses and birds. The ticks are commonly found on vegetation in endemic regions especially in wooded areas common to the animal reservoir. The incidence of human infection coincides with the tick season from May through September (3,5).

Although the symptoms of Lyme disease are varied and sometimes unclear, three distinct phases of the disease are recognized. Early manifestations include a single or multiple rash called erythema migrans (EM), a meningitis stage during the next weeks to months is often seen. Late manifestations are recognized to include arthritis or neurological signs and symptoms. In asymptomatic or subclinical cases, symptoms of infection may not be evident until the later stages of disease (5).

Isolation of *B. species* in culture is definitive evidence of active infection, but is not practical. Detection of specific antibodies is practical but an indirect marker of exposure. Patients produce IgM antibodies within a few weeks of the appearance of EM. Although only IgM antibodies may be detectable during the first month, IgG antibodies increase in most patients after approximately one month. Detectable levels of both IgG and IgM may persist for years (5,6).

Borrelia strains exhibit considerable antigenic variation. Patients often develop early antibodies to the flagellar antigen which can be cross reactive. Patients in the early stage of disease and a portion of patients with late manifestations may not have detectable antibodies. Early antimicrobial treatment, after appearance of EM may lead to diminished antibody concentrations. Serologic tests have been shown to have low sensitivity and specificity and, therefore, cannot be relied upon for establishing a diagnosis of Lyme disease (6,7,8).

The Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme Disease (1994) recommended the use of a two-tier test system for Lyme serology in which positive and equivocal samples from a sensitive first-tier test must be further tested by a more specific method such as Western blot (second tier). Positive results in the second tier test provide supportive evidence of exposure to *B. burgdorferi* which could support a clinical diagnosis of Lyme disease but should not be used as a criterion for diagnosis (9).

II. PRINCIPLE

The Trinity Biotech EU Lyme Disease IgG Test System is an indirect enzyme immunoassay (EIA) technique utilizing the purified native antigens of *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein which are bound to polystyrene microwells. The antibody from the patient sample, which is added to the microwells in the first step of this procedure, binds with the antigen. Following a rinsing period which removes unbound antibody, a peroxidase labeled anti-human IgG is added to each microwell. The conjugate will attach during the second incubation step only if bound human IgG antibody is present from the first step reaction. Following a second rinsing period which removes unbound peroxidase conjugate, a color indicator solution is added to the microwells which will react only in the presence of bound peroxidase. An acid solution is added after a specified period of time in order to stop the enzymatic conversion of the indicator solution for spectrophotometric analysis.

III. REAGENTS SUPPLIED

Each kit contains the following components in sufficient quantities to perform the number of tests indicated on the package label.

1. Purified native antigens of *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) antigens including the specific VlsE protein coated microassay plate: 96 wells, configured in a full plate, stored in a foil pouch with a desiccant. Product number 44-8208G
2. EU Lyme EIA IgG Positive Control: human serum. Proclin (0.1%) added as a preservative. Product number 44-8002, one vial, 100 µL.
3. EU Lyme EIA IgG Low Positive: human serum. Proclin (0.1%) added as a preservative. Product number 44-8003, one vial, 100 µL.
4. EU Lyme EIA Negative Control: human serum. Proclin (0.1%) added as a preservative. Product number 44-8001, one vial, 100 µL.
5. Peroxidase Conjugate, Anti-Human IgG. Goat anti-human IgG, containing Proclin (0.03%) as a preservative. Product number 44-8025G, one bottle, 13.5 ml.
6. EU Lyme EIA Color Developer: Tetramethylbenzidine (TMB). Product number 44-1006, one bottle, 13.0 ml.
7. Stop Solution: Contains a H₃PO₄ solution. Product number 40-1004, one bottle, 15 ml.
8. Serum Diluent. Contains Proclin (0.1%) as a preservative. Product Number 40-8012, one bottle, 100 ml.
9. 10x Wash Solution. Contains PBS, Tween-20. Product number 40-1013, one bottle, 100 ml.

IV. PRECAUTIONS

1. For *In Vitro Diagnostic* use.
2. The preservatives used in the reagents may be toxic if ingested. Do not mouth pipette.
3. This kit contains 1 molar phosphoric acid as a stop solution. Good laboratory procedure should be exercised when using acid solutions. Avoid contact with skin, eyes, or clothing. Use copious amount of water to wash exposed areas.
4. The human serum components used in the preparation of the Controls in this kit have been tested by an FDA approved method for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus 1 & 2 (HIV 1&2), hepatitis C (HCV) as well as hepatitis B surface antigen and were found negative. Because no test methods can offer complete assurance that HIV, HCV, hepatitis B virus, or other infectious agents are absent, specimens and human-based reagents should be handled as if capable of transmitting infectious agents.
5. The Centers for Disease Control and Prevention, and the National Institutes of Health recommend that potentially infectious agents be handled at the Biosafety Level 2 (10).
6. Do not deviate from the specified temperature and timing requirements as listed in the package insert for both incubation and washing steps. Deviations may significantly alter the results of this test.
7. **All reagents must be brought to +20 to +25°C before performing this test procedure. Temperatures above or below the recommended range may result in substantial variation of the test results.**
8. If less than a full plate is to be used, center the strips within the plate frame to secure the strips during the wash steps.
9. Do not interchange kit components from one kit lot with another kit lot.
10. All unused microwells must be stored in desiccation at +2 to +8°C between uses.
11. Avoid cross-contamination of reagents. Wash hands before and after handling reagents. Cross-contamination of reagents and/or samples could cause false results.
12. Wells are to be washed three times.
13. If a sodium hypochlorite (bleach) solution is used as a disinfectant, do not expose the work area during the test procedure to avoid interference with the enzyme activity.
14. Assays designed for detection of antibodies to *Borrelia Afzelii*, *Borrelia Garinii* and *Borrelia burgdorferi* including the VlsE protein:
 - a. Do not indicate when exposure occurred.
 - b. Do not indicate that active replication is occurring or not occurring.
 - c. Frequently yield false-negative and false-positive results.
 - d. Do not have an established role in detecting such antibodies in serum collected during late manifestations of infection.
 - e. Do not often detect antibodies at clinical presentation during early Lyme disease, even when erythema migrans is present and isolation of *Borrelia species* in culture has been accomplished.
15. The concentrations of anti-*Borrelia* antibody in a given specimen determined by assays from different manufacturers may vary due to differences in assay methods and reagent specificity.
16. Do not mix components from different lots and do not interchange microwells or plates from IgG and IgM kits.

V. STORAGE AND STABILITY

1. Store kit at +2 to +8°C.
2. Bring all components to room temperature prior to use.
3. Refer to the expiration date on all reagents.
4. Refer to the expiration date on the microwell strips.
5. Immediately return kit to refrigeration after use.
6. All unused opened microwells must be stored in desiccation at +2 to +8°C between uses.

VI. ADDITIONAL MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

1. Microtubes.
2. Microtube rack.
3. Storage container, 1.0 L, plastic or glass.
4. Pipetors, 10 µL, 100 µL, and 1.0 ml capacity.
5. Pipetor, 100 µL capacity, 8 channel (optional).
6. Waste container.
7. Timer, 30 minute.
8. Plastic squeeze bottle, 500 ml.
9. Absorbent paper (towels).
10. Distilled water.
11. EIA plate reader with 450 nm filter.
12. Desiccant storage for open microwell strips.

VII. REAGENT PREPARATION

1. Prepare 1X wash solution to be used in the assay from the 10X Wash Solution provided. On removal of the 10X Wash Solution from refrigeration, undissolved salts may be present. Allow the reagent to reach room temperature and shake the bottle to dissolve the salts. Do not dispense from the reagent until all salts are dissolved.
2. In order to prepare the 1X Wash solution, dilute 1 part of concentrate with 9 parts of distilled or deionized water in a clean plastic squeeze bottle. For each 8-well strip to be used, prepare a minimum of 50 ml diluted wash solution.
3. The Color Developer is ready to use.
4. The Conjugate is ready to use.
5. The Serum Diluent is ready to use.

VIII. SPECIMEN COLLECTION

Serological specimens should be collected under aseptic conditions. Avoid hemolysis by prompt separation of the serum from the clot. Serum should be stored at +2 to +8°C if it is to be analyzed within 4-7 days. Serum may be held for 3 to 6 months by storage at -20°C or lower. Lipemic and strongly hemolytic serum should be avoided. When specimens are shipped at ambient temperatures, additions of a preservative such as 0.01% thimerosal (merthiolate) or 0.1% sodium azide is strongly recommended. The NCCLS provides recommendations for storing blood specimens (Approved Standard Procedure for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A2 1999) (11).

IX. PREPARATION OF SPECIMENS AND CONTROLS

A Positive Control, three Low Positives, a Negative Control, and a reagent blank must be run in each microplate tested. **Dilute kit controls at the same time as patient specimens for each run.** The reagent blank is prepared from Serum Diluent without the addition of human serum. Prepare the controls and patient specimens in appropriately marked pre-dilution tubes as follows:

1. Add 1.0 ml of Serum Diluent to each tube.
2. Add 10 µl of each serum to the appropriate tube and mix thoroughly.
3. Place each tube in an appropriate holding rack.
4. Specimens, controls, and calibrators are now diluted 1:100 and are ready for application to the *Borrelia* sensitized microwell plates.

X. TEST PROCEDURE

1. Remove the full plate from its foil pouch. If less than a full plate is used, strips must be centered within the plate frame to secure the strips during the wash steps. Place unused strips back into the foil pouch and seal tightly. Unused strips must be placed in desiccation at +2 to +8°C.
2. Add 100 µL of each control, specimen and reagent blank dilution into wells and record on EIA worksheet.
3. Incubate at (20-25°C) for 30 minutes.
4. Shake out contents of the wells. Refill each well with wash solution.
5. Repeat Step 4 two times. Blot strips dry on absorbent paper.
6. Add 100 µL of conjugate into each well.
7. Incubate at (20-25°C) for 30 minutes.
8. Repeat Steps 4 and 5.
9. Add 100 µL of Color Developer into each well.
10. Incubate at (20-25°C) for 15 minutes. Positive wells will develop a blue color.
11. Add 100 µL of Stop Solution to each well. Mix by gently tapping side of plate to evenly disperse Stop Solution. Do not create bubbles. Positive wells will develop a yellow color.
12. Incubate for 2 minutes.
13. Read the test strips by an EIA plate reader at 450nm within 30 minutes after addition of stop solution.

XI. QUALITY CONTROL

A spectrophotometer or EIA plate reader with a 450 nm filter is needed for the analysis of the color intensity.

1. Read the plate at 450 nm. Print out the optical density values (OD₄₅₀).
2. Round the blank well OD to 2 digits to the right of the decimal and subtract from all test ODs. (0.795 = 0.80, 2.333 = 2.33).
3. Round all test ODs as above.
4. Calculate the mean OD of the three Low Positive wells. If any of the three wells has an OD blank more than 10% from the mean, disregard that value and recalculate the mean from the remaining two wells. If the ODs from the remaining 2 wells are not within 10% of the mean, assay results are invalid and must be repeated.
5. To calculate a Lyme Index Value (LIV), divide the OD of the sample by the mean O.D. of the Low Positive Control.
6. The assay is considered valid and reportable when:
 - a. The Positive Control has a Lyme Index Value ≥ 1.50 .
 - b. The Negative Control has a Lyme Index Value < 0.50 .
 - c. The Low Positive Control has an O.D. value of 0.45-0.95.
 - d. The Blank has an O.D. value of < 0.175 .

XII. INTERPRETATION OF RESULTS

A Lyme Index Value of 1.0 or greater should be considered presumptive evidence of exposure to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and/or *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein

XIII. REPORTING**Positive - Lyme Index of ≥ 1.0**

A positive result is presumptive evidence of exposure to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and/or *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein. The result should be supplemented by a second tier test that is more specific for antibodies to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein and should not be reported until second-step testing is complete. A positive result is not an indication of when exposure occurred.

Negative - Lyme Index of < 0.5

No detectable antibodies to *B. burgdorferi*. A negative result indicates that there was not serologic evidence of exposure to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and/or *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein at the time the specimen was collected. A negative result should not be the basis for excluding *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein as the cause of illness, especially if blood was collected within 2 weeks of when symptoms began. If Lyme disease is strongly suspected, a second specimen should be collected 2 to 4 weeks after the first specimen and tested then.

Equivocal - Lyme Index of ≥ 0.5 and ≤ 0.99

An equivocal result is presumptive evidence of possible exposure to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and/or *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein. The result should be supplemented by a second tier test that is more specific for antibodies to *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) including the specific VlsE protein and should not be reported until second-step testing is complete.

XIV. LIMITATIONS OF PROCEDURE

1. Sera from patients with other pathogenic spirochetal diseases such as syphilis, yaws, pinta, leptospirosis, and relapsing fever may give false positive results. Sera from patients with mononucleosis or lupus erythematosus may also give false positive results. In cases where false positive results occur, clinical, epidemiologic and laboratory workups should be carried out. Although the clinical picture is quite different between active syphilis and Lyme disease, an easy means of differentiating these two diseases is by the use of the VDRL or RPR tests. In active syphilis, the VDRL or RPR are positive. In Lyme disease, the VDRL and RPR are negative.
2. Patients with early stages of Lyme disease may not test positive with this test. The IgG antibodies may not have reached detectable levels in early Lyme during the EM clinical phase of the disease. Negative results in early stages of disease have low predictive value.
3. In order to test for early stage I infection, use a reagent system designed to detect IgM antibody without interference from rheumatoid factor and IgG antibodies.
4. Antibiotic therapy given early in the disease may prevent the development of an antibody response.
5. The evaluation of all test results must include the clinical history presented by the patient, the patient's exposure in endemic regions for Lyme disease, epidemiological data, other test results, and any other spirochetal diseases. Positive test results in patients for which a history of exposure to Lyme disease, or symptoms or clinical findings consistent with Lyme disease do not exist may have a low predictive value.
6. Positive or equivocal first-tier test results should not be reported until second-tier testing of the specimen is performed using a method that is more specific such as Western blot.
7. The use of this assay has not been evaluated for individuals who have received Lyme disease vaccine.

XV. EXPECTED VALUES

In patients without present or past infection with *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and/or *B. burgdorferi* (B 31), test results should be negative except for patients with cross-reacting antibodies (See Limitations).

In patients with Lyme disease, the test results are dependent on the stage of the disease. IgG antibody titers can be detected within two or three weeks following onset of disease. The VlsE protein is a very early marker of the IgG immune response and antibodies to the VlsE may persist. As the disease progresses, the chances of a positive test increases. Persons presenting within 3 weeks of onset of EM are positive for IgG approximately 25% of the time. Persons with second stage symptoms are almost always positive as are persons with third stage symptoms.

IgG testing is most useful for the detection of ongoing or past cases of Lyme disease. For early detection, a test which detects the IgG response to the VlsE protein or IgM class antibodies is recommended. IgM antibodies rise quickly after infection, reaching their peak within 3 weeks and declining rapidly. IgG antibodies start rising 2 to 3 weeks after infection and persist while symptoms are present and drop slowly during recovery (5,6).

XVI. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**Specificity**

The Specificity of Trinity Biotech IgG was evaluated at an independent diagnostic laboratory in England. The study was conducted on a panel of 100 serum samples taken from presumably healthy donors living in an area endemic for Lyme borreliosis.

Relative Specificity 98% (98/100)

Sensitivity

The study was conducted on three panels of serum samples from patients with some of the most common clinical manifestations of a *Borrelia* infection: 55 serum samples from patients with Erythema migrans, 30 serum samples from patients with Arthritis and 40 serum samples from patients with Neuro-Borreliosis.

	Diagnostic Sensitivity for IgG	Diagnostic Sensitivity between both IgG and IgM
Erythema migrans	9 out of 55 84%	8 out of 55 85.5%
Arthritis	3 out of 30 90%	2 out of 30 93%
Neuro-Borreliosis	1 out of 40 97.5%	0 out of 40 100%

Cross-Reactivity

Sera from patients with syphilis, inflammatory diseases (rheumatoid factor (RF) positive, autoimmune and *Toxoplasma gondii*) were tested in Trinity Biotech IgG with the following results:

Patient Sera	Number of sera	Number of Positives
Syphilis	20	2
RF	20	1
Autoimmune	20	0
Toxoplasma gondii	20	0

XVII. REPRODUCIBILITY**Inter Assay**

Sample	Mean	SD	% CV
1	0.070	0.008	11.7
2	3.893	0.172	4.4
3	2.400	0.164	6.8
4	3.537	0.167	4.7
5	0.423	0.053	12.5
6	3.063	0.144	4.7

Intra Assay

Sample	Mean	SD	CV
1	0.084	0.010	12.0
2	3.671	0.245	6.7
3	2.304	0.069	3.0
4	3.166	0.274	8.7
5	0.413	0.036	8.7
6	2.924	0.098	3.4

XVIII. REFERENCES

1. Steere et.al. 1986. J. Infect. Dis. 154(2): 295-300.
2. Steere et.al. 1977. Arthritis Rheumatism. 20(1): 7-17.
3. Steere et.al. 1983. N.E.J.M. 308(13): 733-740.
4. Burgdorfer et.al. 1982. Science. 216: 317-1319.
5. Barbour et.al. 1988. Clin. Microbiol. Rev. 1(4): 399-411.
6. Aguero-Rosenfeld et.al. 1993. J. Clin. Microbiol. 31(12): 3090-3095.
7. Magnarelli et.al. 1987. J. Infect. Dis. 156(1): 183-188.
8. Bakken et.al. 1997. J. Clin Microbiol. 35(3):537-543.
9. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Morbid. Mortal.Weekly Rep. 44:590-591.
10. CDC/NIH Guidelines. 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd Ed. pp 9-12. USHHS, PHS.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Publication H18-A2.

Dosage EIA IgG + VlsE EU Lyme

Dosage immunoenzymatique IgG+ VlsE EU Lyme pour la détection des anticorps IgG dirigés contre *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31)

Référence # 44-8696G

96 analyses

Conservez le kit entre +2 et +8 °C

USAGE PRÉVU

Le dosage immunoenzymatique (ELISA) IgG + VlsE EU Lyme développé par Trinity Biotech est destinée à l'analyse qualitative des anticorps IgG dirigés contre *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) dans le sérum humain. Ce test doit être utilisé pour analyser le sérum de patients ayant des antécédents et des symptômes d'infection par *Borrelia*. Tous les spécimens positifs et équivoques doivent être testés de nouveau avec un test spécifique de deuxième niveau du type Western Blot. Les résultats positifs de deuxième niveau indiquent une infection par *Borrelia*. Un diagnostic de maladie de Lyme doit reposer sur des antécédents et des symptômes définis (du type érythème migrant) et d'autres données de laboratoire en sus de la présence des anticorps dirigés contre *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE. Des résultats négatifs (de premier ou de second niveau) ne peuvent pas servir à exclure la maladie de Lyme.

I. SYNTHÈSE

La maladie de Lyme est une pathologie multisystémique provoquée par le spirochète *Borrelia burgdorferi* (1). La maladie a été décrite en Europe depuis le début du siècle. Elle a été décrite aux Etats-Unis pendant une épidémie en 1975, chez des enfants de Old Lyme, Connecticut, qui présentaient des symptômes arthritiques. Steere, et al. ont reconnu la maladie comme entité clinique unique (2, 3). Les symptômes de la maladie de Lyme ont été confondus avec ceux de nombreuses autres maladies, dont : arthrite chronique juvénile, lupus érythémateux, sclérose en plaques, maladie de Bell, fièvre rhumatismale, syndrome Reiter, myocardite et méningite virale (4). Les souches prédominantes en Europe sont *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* et *Borrelia burgdorferi*.

Le spirochète est transmis par les tics du genre *Ixodes* d'animaux porteurs (cervidés, souris, chiens, chevaux, oiseaux). Les tics sont communs sur la végétation dans les régions endémiques, surtout les zones boisées partagées par les espèces porteuses. L'incidence des infections chez l'homme coïncide avec la saison des tics, de mai à septembre (3, 5).

Bien que les symptômes de la maladie de Lyme soient variés et parfois peu clairs, on reconnaît trois phases distinctes. Les premiers signes incluent des rougeurs simples ou multiples appelées érythème migrant (EM) ; une phase de méningite apparaît souvent pendant les semaines ou mois qui suivent. On sait que les manifestations tardives incluent l'arthrite et des signes ou symptômes neurologiques. Dans les cas asymptomatiques ou infracliniques, les symptômes de l'infection pourraient ne pas apparaître clairement avant les phases tardives de la maladie (5).

L'isolation des espèces de *Borrelia* en culture démontre effectivement la présence d'une infection active mais est peu commode. Par contre, la détection d'anticorps spécifiques est plus commode, mais représente un marqueur indirect d'exposition. Les patients produisent des anticorps IgM dans les quelques semaines qui suivent l'apparition de l'EM. Bien que seuls des anticorps IgM soient détectables dans le premier mois, le taux d'anticorps IgG augmente chez la plupart des

patients après environ un mois. Des niveaux détectables d'IgG et d'IgM à la fois peuvent persister pendant des années (5, 6).

Les espèces de *Borrelia* présentent des variations antigéniques considérables. Des anticorps précoces aux antigènes flagellaires à réaction croisée se développent souvent. Les patients en phase initiale et une partie des patients présentant des signes en phase avancée pourraient ne pas présenter d'anticorps. Un traitement antimicrobien précoce après l'apparition de l'EM peut entraîner une diminution des taux d'anticorps. Il a été démontré que les tests sérologiques ont une sensibilité et spécificité réduite et, donc, ne peuvent être utilisés pour établir un diagnostic de maladie de Lyme (6, 7, 8).

La Deuxième Conférence Nationale sur le Diagnostic Sérologique de la Maladie de Lyme (1994) a recommandé l'utilisation d'un système de dosage à deux niveaux pour la pathologie de Lyme dans lequel les échantillons positifs et équivoques d'un test sensible de premier niveau seraient testés ultérieurement par une méthode plus spécifique du type Western Blot (deuxième niveau). Les résultats positifs avec le test de second niveau sont indicatifs d'une exposition à *Borrelia* qui pourrait renforcer un diagnostic clinique de maladie de Lyme, mais ne peuvent pas faire lieu de critère de diagnostic même (9).

II. PRINCIPE

Le dosage immunoenzymatique (ELISA) IgG EU Lyme développé par Trinity Biotech est un dosage immunoenzymatique indirect utilisant les antigènes natifs purifiés de *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE adsorbé aux surfaces plastiques du type polystyrène (phase solide).

Lorsque les antigènes liés aux puits sont mis en contact avec le sérum d'un patient, les anticorps spécifiques, s'ils sont présents, se lient à eux sur la phase solide de sorte à former un complexe antigène-anticorps. Les anticorps non liés sont éliminés par lavage. Des anti-IgG humaines marquées à la peroxydase sont ajoutées à chaque puits. Ce conjugué ne s'attache au complexe antigène-anticorps que si l'anticorps anti-IgG humaine est présent suite à la réaction de première étape. Le conjugué en excès est éliminé par lavage, suivi par l'addition d'un chromogène. En cas de présence d'anticorps spécifiques, le mélange réactionnel sera coloré. Une solution acide est ajoutée après une certaine période de temps afin de suspendre la conversion enzymatique de la solution chromogène pour analyse spectrophotométrique.

III. RÉACTIFS FOURNIS

Chaque trousse contient les éléments suivants en quantités suffisantes pour effectuer le nombre de tests indiqué sur l'étiquette.

1. Microplaque enduite d'antigènes natifs purifiés de *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE: 96 puits répartis sur une plaque complète et placés dans un sachet métallisé avec dessiccateur. Référence Produit 44-8208G
2. Contrôle positif *EU Lyme* EIA IgG : sérum humain. Contient 0,1% de Proclin comme agent de conservation. Référence produit 44-8002, un flacon de 100 µl.
3. Contrôle faiblement positif *EU Lyme* EIA IgG : sérum humain. Contient 0,1% de Proclin comme agent de conservation. Référence produit 44-8003, un flacon de 100 µl.
4. Contrôle négatif *EU Lyme* EIA : sérum humain. Contient 0,1% de Proclin comme agent de conservation. Référence produit 44-8001, un flacon de 100 µl.
5. Conjugué à la peroxydase, anti-IgG humaine. Anti-IgG humaine de chèvre contenant 0.03% de Proclin comme agent de conservation. Référence produit 44-8025G, un flacon de 13,5 ml.

III. RÉACTIFS FOURNIS (suite)

6. Révélateur chromogène *EU Lyme* EIA : Tétraméthylbenzidine (TMB). Référence produit 44-1006, un flacon de 13,0 ml.
7. Solution d'arrêt : Contient une solution au H₃PO₄. Référence produit 44-1004, un flacon de 15 ml.
8. Diluant du sérum : Contient de la Proclin (0,1 %) comme agent de conservation. Référence produit 44-8012, un flacon de 100 ml.
9. 10 x solution de lavage : contient du PBS, du Tween-20. Référence produit 44-1013, un flacon de 100 ml.

IV. PRÉCAUTIONS

1. Pour usage *diagnostique in vitro*.
2. Les agents de conservation dans les réactifs sont toxiques en cas d'ingestion. Ne pipetez pas à la bouche.
3. Le kit contient une solution 1 molaire d'acide phosphorique comme solution d'arrêt. Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être suivies lors de l'utilisation de solutions acides. Évitez tout contact avec la peau, les yeux ou les habits. Rincez abondamment à l'eau pour nettoyer les zones exposées.
4. Les composants sérologiques humains utilisés dans la préparation des contrôles dans ce kit ont fait l'objet de tests homologués par la FDA pour détecter la présence d'anticorps aux virus de l'immunodéficience humaine de types 1 et 2 (VIH 1 & 2), de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B avec résultat négatif pour chacun desdits anticorps. Aucun test ne pouvant toutefois garantir de façon absolue l'absence des VIH, du HCV, du virus de l'hépatite B ou de tout agent infectieux, les spécimens et réactifs d'origine humaine doivent être traités comme vecteurs potentiels d'infections.
5. Les Centres pour le Contrôle et la Prévention des maladies et les Instituts nationaux de la santé recommandent de traiter les agents potentiellement infectieux conformément au niveau 2 de sécurité biologique (10).
6. Ne vous éloignez pas de la température et des temps spécifiés dans les instructions jointes tant pour l'incubation que pour les phases de lavage. Toute déviation pourrait altérer les résultats de façon significative.
7. **Tous les réactifs doivent être portés à des températures de + 20 à +25°C avant d'exécuter les procédures. Les températures supérieures ou inférieures aux valeurs recommandées pourraient entraîner des variations importantes des résultats.**
8. Si la plaque à utiliser n'est pas complète, centrer les barrettes par rapport au cadre de sorte à ce que celles-ci soient bien fixées durant le lavage.
9. N'échangez pas les divers éléments entre kits appartenant à des lots différents.
10. Toutes les microplaques non utilisées doivent être conservées en condition de dessiccation à +2 - +8°C entre deux utilisations.
11. Évitez toute contamination croisée des réactifs. Lavez-vous les mains avant et après avoir utilisé les réactifs. Toute contamination croisée des réactifs et/ou des échantillons pourrait fausser les résultats.
12. Les puits doivent être lavés trois fois.
13. Si une solution à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel) est utilisée pour désinfecter, évitez toute exposition avec la zone de travail pendant l'analyse en raison des risques d'interférences avec l'activité des substances enzymatiques.
14. Les essais conçus pour détecter des anticorps contre *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* et *Borrelia burgdorferi* :
 - a. N'indiquent pas quand l'exposition a eu lieu.
 - b. N'indiquent pas si une réplication active est en cours ou non.

- c. Donnent fréquemment des résultats faussement négatifs ou faussement positifs.
 - d. Rôle non établi dans la détection desdits anticorps dans le sérum prélevé pendant le développement ultérieur de l'infection.
 - e. Ne détectent pas souvent les anticorps en présentation clinique en phase précoce de la maladie de Lyme, même en présence d'un érythème migrant et après isolation des espèces de *Borrelia* en culture.
15. Les concentrations d'anticorps anti-*Borrelia burgdorferi* dans un spécimen donné analysé suivant des techniques appartenant à d'autres fabricants peuvent varier du fait de la diversité des méthodes utilisées et des caractéristiques des réactifs employés.
 16. Ne mélangez pas les composants de lots différents et n'interchangez pas les microplaques des kits IgG et IgM.

V. CONSERVATION ET STABILITÉ

1. Conservez la trousse entre +2 et +8°C
2. Ramenez à température ambiante les différents composants avant de les utiliser.
3. Référez-vous à la date de péremption sur tous les réactifs.
4. Référez-vous à la date de péremption sur les microplaques.
5. Remettez tout de suite le kit au réfrigérateur après usage.
6. Toutes les microplaques ouvertes non utilisées doivent être conservées en condition de déshydratation à +2 - +8°C entre deux utilisations.

VI. MATÉRIAUX ADDITIONNELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

1. Microtubes.
2. Portoirs de microtubes.
3. Epruvette de 1,0 l, en plastique ou en verre.
4. Pipettes, 10 µl, 100 µl et 1,0 ml.
5. Pipette, 100 µl, 8 canaux (optionnel).
6. Conteneur pour déchets.
7. Chronomètre, 30 minutes.
8. Pissette en plastique, 500 ml.
9. Essuie-tout en papier.
10. Eau distillée.
11. Lecteur de plaques pour essais immunoenzymatiques avec filtre de 450 nm.
12. Espace à l'abri de l'humidité pour déshydratant pour microplaques après ouverture.

VII. PRÉPARATION DU RÉACTIF

1. Pour le dosage, préparer une solution de lavage 1X à partir de la solution de lavage 10X fournie. Lorsque vous retirez la solution de lavage (10X) du réfrigérateur, des sels non dissous peuvent apparaître. Laissez le réactif à température ambiante et remuez la bouteille pour dissoudre les sels. N'utilisez pas le réactif avant dissolution des sels.
2. Pour préparer la solution de lavage (1X), diluez un volume de concentré dans 9 volumes d'eau distillée ou désionisée dans une pissette propre en plastique. Pour chaque bande de 8 puits à utiliser, préparez un minimum de 50 ml de solution de lavage.
3. Le révélateur chromogène est prêt à l'emploi.
4. Le conjugué est prêt à l'emploi.
5. Le diluant de sérum est prêt à l'emploi.

VIII. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les spécimens sérologiques doivent être prélevés dans des conditions aseptiques. Une prompte séparation du sérum du caillot permet d'éviter l'hémolyse. Le sérum doit être conservé entre 2 et 8°C s'il doit être analysé dans les 4 à 7 jours suivants le prélèvement. Le sérum peut être conservé de 3 à 6 mois à - 20°C ou moins. Les sérums lipémiques ou fortement hémolytiques sont à proscrire. Lorsque les spécimens sont expédiés à température ambiante, il est fortement recommandé d'ajouter un conservateur du type thimérosol à 0,01 % (merthiolate) ou de l'azide de sodium à 0,1 %. Le NCCLS propose des recommandations pour la conservation des spécimens sanguins (Approved Standard Procedure for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A2 1999) (11).

IX. PRÉPARATION DES SPÉCIMENTS ET DES CONTRÔLES

Un contrôle positif, trois contrôles faiblement positifs, un contrôle négatif et un blanc réactif doivent être prévus pour chaque microplaque testée. **Diluez les contrôles du kit en même temps que les échantillons de patient sur chaque série.** Le blanc est préparé à partir du diluant sérum sans ajouter de sérum humain. Préparez les contrôles et échantillons de patient dans des tubes de pré-dilution dûment étiquetés comme suit :

1. Placer chaque tube dans le portoir approprié.
2. Ajoutez 10 µl de chaque sérum dans le tube approprié.
3. Ajoutez 1.0 ml de Diluant sérum à chaque tube.
4. Mélangez soigneusement.
5. Les spécimens, contrôles et étalons sont maintenant dilués à 1:100 et ils sont prêts à être appliqués aux micropuits sensibilisés à *Borrelia*.

X. PROTOCOLE OPÉRATOIRE

1. Retirez la plaque complète de son sachet. Si la plaque à utiliser n'est pas complète, centrer les barrettes par rapport au cadre de sorte à ce que celles-ci soient bien fixées durant le lavage. Remplacez les barrettes non utilisées dans le sachet et refermez. Les barrettes non utilisées doivent être gardées en déshydratation à +2 - +8°C.
2. Ajoutez 100 µl de chaque dilution de contrôles, étalon et blanc réactif dans les puits et enregistrez-les sur les fiches de travail de dosage immunoenzymatique.
3. Laissez incuber à 20-25°C pendant 30 minutes.
4. Videz le contenu des puits en remuant. Remplissez chaque puits avec de la solution de lavage.
5. Répétez l'étape 4 deux fois. Séchez les barrettes avec du papier absorbant.
6. Ajoutez 100µl de conjugué dans chaque puits.
7. Laissez incuber à 20-25°C pendant 30 minutes.
8. Répétez les étapes 4 et 5.
9. Ajoutez 100µl de révélateur chromogène dans chaque puits.
10. Laissez incuber à 20-25°C pendant 10 minutes. Les puits positifs présenteront une couleur bleue.
11. Ajoutez 100µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Mélangez délicatement en tapotant les côtés de la plaque pour distribuer de façon régulière la solution d'arrêt. Ne pas faire de bulles. Les puits positifs présenteront une couleur jaune.
12. Laissez incuber pendant 2 minutes.
13. Placez les barrettes de test sur un lecteur de plaques à 450 nm dans les 30 minutes après ajout de la solution d'arrêt.

XI. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un spectrophotomètre ou lecteur de plaque immunoenzymatique avec un filtre à 450 nm est requis pour l'analyse de l'intensité de couleur.

1. Lisez la plaque à 450 nm. Imprimez les valeurs de densité optique (OD₄₅₀).
2. Arrondissez la OD du puits de blanc à 2 chiffres à droite de la virgule et soustrayez à toutes les OD du test. (0.795 = 0.80, 2.333 = 2.33).
3. Arrondissez toutes les OD comme ci-dessus.
4. Calculez la OD moyenne des trois puits de contrôles faiblement positifs. Si l'un des trois puits à une OD supérieure de 10 % à la moyenne, laissez cette valeur de côté et recalculez la moyenne en utilisant les deux autres puits. Si les OD des autres puits ne sont pas dans les 10 % de la moyenne, les résultats du dosage seront invalidés et le test doit être répété.
5. Pour calculer la Valeur de l'Indice de Lyme (LIV), divisez la OD arrondie de l'échantillon par la moyenne des OD des contrôles faiblement positifs.
6. Le test est considéré comme valide et digne de foi quand :
 - a. Le contrôle positif à haute concentration a un Indice de Lyme $\geq 1,50$.
 - b. Le contrôle négatif a un Indice de Lyme $\leq 0,50$.
 - c. Le contrôle faiblement positif a une OD comprise entre 0.45 et 0.95.
 - d. Le blanc a une OD $< 0,175$.

Note : Les contrôles de ce kit sont conçus pour contrôler une éventuelle défaillance de l'essai et ne pourront servir de contrôle de précision à valeur seuil.

XII. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un Indice de Lyme de 1,0 ou plus devra être considéré comme indiquant une exposition à *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et/ou *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE.

XIII. RAPPORT D'ANALYSE

Positif – Indice de Lyme égal ou supérieur à 1,0.

Un résultat positif indique une exposition probable à *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et/ou *Borrelia burgdorferi* (B31). Le résultat devra être complété par un test de second niveau plus spécifique pour les anticorps dirigés contre *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) et ne devra pas faire l'objet d'un rapport avant la réalisation complète de ce test de second niveau. Un résultat positif n'indique pas quand l'exposition a eu lieu.

Négatif – Indice de Lyme $\leq 0,5$.

Aucun anticorps anti-*Borrelia* détecté. Un résultat négatif indique l'absence de signe sérologique d'exposition à *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et/ou *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE au moment où l'échantillon a été prélevé. Ce résultat négatif ne peut toutefois exclure *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE comme cause de la maladie, surtout si le sang utilisé a été prélevé dans les 2 semaines à compter de l'apparition des premiers symptômes. Si l'on suspecte une maladie de Lyme, un second spécimen devra être prélevé dans les 2 à 4 semaines après le premier spécimen et testé.

Résultat équivoque – Indice de Lyme $\geq 0,5$ et $\leq 0,99$.

Un résultat équivoque indique une exposition probable *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et/ou *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE. Le résultat devra être complété par un test de second niveau plus spécifique pour les anticorps dirigés contre *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) et *Borrelia burgdorferi* (B31) incluant la protéine VlsE et ne devra pas faire l'objet d'un rapport avant la réalisation complète de ce test de second niveau.

XIV. LIMITES DE LA PROCÉDURE

1. Le sérum de patients affectés par d'autres spirochètoses du type syphilis, piens, caraté, leptospirose et borrélioses peut donner des résultats faussement positifs. Le sérum des patients avec mononucléose ou lupus érythémateux peut aussi donner de faux résultats positifs. En cas de faux positifs, un traitement clinique, épidémiologique ou de laboratoire conclusif doit être effectué. Bien que le cadre clinique soit différent entre syphilis active et maladie de Lyme, un moyen facile de distinguer les deux est d'utiliser les tests VDRL et RPR. Les tests sont positifs pour la syphilis active. Ils sont négatifs pour la maladie de Lyme.
2. Les patients en phase précoce de la maladie de Lyme peuvent ne pas donner de résultat positif avec ce test. Les anticorps IgG peuvent ne pas avoir atteint un niveau détectable dans la phase précoce de la maladie durant la phase clinique d'érythème migrant. Les résultats négatifs dans les premières phases de la maladie ont donc une valeur prédictive limitée.
3. Afin d'effectuer un test durant la phase précoce de l'infection, utilisez un réactif préconisé pour détecter les anticorps IgM sans interférence des facteurs rhumatoïdes et des anticorps IgG.
4. Un traitement précoce aux antibiotiques peut empêcher une réponse des anticorps.
5. L'évaluation de tous les résultats doit prendre en compte l'historique clinique du patient, l'exposition du patient dans des régions endémiques pour la maladie de Lyme, les données épidémiologiques, de même que les résultats d'autres analyses et toute autre spirochètose. Des résultats positifs chez un patient pour lequel il n'y a ni un historique d'exposition à la maladie de Lyme, ni des symptômes, ni des résultats cliniques cohérent avec la maladie de Lyme doit avoir une valeur prédictive limitée.
6. Des résultats positifs ou équivoques au premier niveau ne doivent pas faire l'objet d'un rapport avant la réalisation complète d'une analyse de second niveau avec une méthode plus spécifique du type Western Blot.
7. L'utilisation de ce test n'a pas été évaluée pour les personnes ayant été vaccinées contre la maladie de Lyme.

XV. VALEURS ATTENDUES

Chez les patients sans infection présente ou passée par *Borrelia*, les résultats devraient être négatifs sauf pour les individus avec des anticorps présentant une réactivité croisée (voir Limitations).

Chez les patients avec maladie de Lyme, les résultats dépendent du stade auquel la maladie a progressé. Les titres des anticorps IgG peuvent être détectés dans les deux à trois semaines après l'apparition de la maladie. La protéine VlsE est un marqueur précoce de la réponse immunitaire à IgG et les anticorps dirigés contre la protéine VlsE persistent. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les chances d'une réponse positive au test augmentent. Les personnes se présentant dans les 3 semaines de l'apparition de l'EM ont 25 % de probabilité de répondre positivement aux IgG. Les personnes avec symptômes de second degré répondent presque toujours positivement, comme les personnes au troisième degré.

Le test des IgG est utile avant tout pour détecter les cas présents ou passés de maladie de Lyme. Pour une détection précoce, une analyse détectant les anticorps de la catégorie des IgM est recommandée. Les taux d'IgM augmentent rapidement après l'infection, atteignant un pic dans les 3 semaines pour retomber ensuite. Les anticorps IgG par contre commencent à augmenter de 2 à 3 semaines après l'infection et persistent tant que les symptômes restent présents pour retomber lentement en cours de guérison (5, 6).

XVI. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

Spécificité

La spécificité des anticorps IgM de Trinity Biotech a été évaluée dans un laboratoire de diagnostic Independent en Angleterre. L'étude a été réalisée sur un panel de 100 échantillons de sérum prélevés sur des donneurs présumés en bonne santé, vivant dans une région endémique pour la maladie de Lyme.

Spécificité relative: 98% (98/100)

Sensibilité

L'étude a été réalisée sur 3 panels d'échantillons de sérums de patients ayant certaines des manifestations cliniques les plus communes d'une infection à *Borrelia* : 55 sérums prélevés des patients ayant un érythème migrant, 30 échantillons chez des patients avec arthrite et 40 sérums chez des patients ayant une neuro-Borreliose.

	Sensibilité du diagnostic pour les IgG	Sensibilité du diagnostic entre IgG et IgM
Erythème migrant	84% (9/55)	85.5% (8/55)
Arthrite	90% (3/30)	93% (2/30)
Neuro-Borreliose	97.5% (1/40)	100% (0/40)

Réactivité croisée

Les sérums de patients ayant la syphilis, une maladie inflammatoire (facteur rhumatoïde (RF) positif), une maladie auto-immune et un toxoplasma gondii ont été testés avec le kit IgM de Trinity Biotech avec les résultats suivants :

Sérum	Nombre de sérum	Nombre de positif
Syphilis	20	2
RF	20	1
Autoimmune	20	0
Toxoplasma gondii	20	0

XVII. REPRODUCTIBILITE

Variations Inter Essai

Echantillon	Moyenne	SD	% CV
1	0.070	0.008	11.7
2	3.893	0.172	4.4
3	2.400	0.164	6.8
4	3.537	0.167	4.7
5	0.423	0.053	12.5
6	3.063	0.144	4.7

Variation Intra Essai

Echantillon	Moyenne	SD	% CV
1	0.084	0.010	12.0
2	3.671	0.245	6.7
3	2.304	0.069	3.0
4	3.166	0.274	8.7
5	0.413	0.036	8.7
6	2.924	0.098	3.4

VIII. RÉFÉRENCES

12. Steere et.al. 1986. J. Infect. Dis. 154(2): 295-300.
13. Steere et.al. 1977. Arthritis Rheumatism. 20(1): 7-17.
14. Steere et.al. 1983. N.E.J.M. 308(13): 733-740.
15. Burgdorferi et.al. 1982. Science. 216: 317-1319.
16. Barbour et.al. 1988. Clin. Microbiol. Rev. 1(4): 399-411.
17. Agüero-Rosenfeld et.al. 1993. J. Clin. Microbiol. 31(12): 3090-3095.
18. Magnarelli et.al. 1987. J. Infect. Dis. 156(1): 183-188.
19. Bakken et.al. 1997. J. Clin Microbiol. 35(3):537-543.
20. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Morbid. Mortal.Weekly Rep. 44:590-591.
21. CDC/NIH Guidelines. 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd Ed. pp 9-12. USHHS, PHS.
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Publication H18-A2.

EU-Lyme+VlsE-IgG-EIA-Testsystem

EU-Lyme+VlsE-IgG-Enzym-Immunoassay (EIA)-Testsystem zur Erkennung von IgG-Antikörpern gegen *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *Borrelia burgdorferi* (B31) einschließlich des Proteins VlsE

Produkt-Nr. 44-8696G

**96 Bestimmungen
Kit bei +2 bis +8° C lagern**

VERWENDUNGSZWECK

Beim EU-Lyme+VlsE-Enzym-Immunoassay (EIA)-Testsystem von Trinity Biotech handelt es sich um einen qualitativen Test, der Indizien für den Nachweis menschlicher IgM-Antikörper gegen *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *Borrelia burgdorferi* (B-31) einschließlich des Proteins VlsE in Humanserum liefert. Dieses EIA-System ist zum Testen des Serums von Patienten mit Symptomen einer Borreliose bestimmt. Alle positiven und nicht eindeutigen Proben müssen mit einem hochspezifischen Test der nächsten Stufe, z.B. dem Western Blot, erneut getestet werden. Ein positives Ergebnis dieses zweiten Tests bestätigt eine Borrelioseinfektion. Die Diagnose einer Lyme-Borreliose muss zusätzlich zum Vorhandensein von Antikörpern gegen *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (B-31) und *B. burgdorferi* (B31) einschließlich des Proteins VlsE auf der Anamnese und Symptomen (wie z.B. Erythema migrans) sowie anderen Labordaten basieren. Negative Ergebnisse (entweder im Test der ersten oder der zweiten Stufe) bedeuten nicht, dass eine Lyme-Borreliose ausgeschlossen werden kann.

I. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Lyme-Borreliose handelt es sich um eine multisystemische Erkrankung, die durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* (1) hervorgerufen wird. Die Krankheit ist in Europa seit dem Anfang dieses Jahrhunderts dokumentiert. In den Vereinigten Staaten wurde die Erkrankung im Jahre 1975 in Old Lyme Connecticut während einer Epidemie unter Kindern, die arthritische Symptome aufwiesen, dokumentiert. Steere et al. erkannten die Krankheit als eine eindeutige klinische Entität (2, 3). Die Symptome der Lyme-Borreliose wurden mit vielen Krankheiten verwechselt, insbesondere mit juveniler rheumatoider Arthritis, Lupus erythematosus, Multipler Sklerose, Bell-Lähmung, rheumatischem Fieber, der Reiter-Krankheit, Myokarditis sowie Virus-Meningitis (4). Die in Europa vorherrschenden Bakterienstämme sind *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi*.

Die Spirochäte wird durch Zecken der Art *Ixodes* von tierischen Reservoirs wie Rehen, Mäusen, Hunden, Pferden und Vögeln übertragen. Diese

Zecken sind gewöhnlich in der Vegetation endemischer Regionen vorzufinden, besonders in für das tierische Reservoir typischen Waldgebieten. Das Auftreten der humanen Infektion fällt mit der Zeckensaison von Mai bis September zusammen (3, 5).

Trotz der unterschiedlichen und manchmal unklaren Symptome der Lyme-Borreliose sind drei verschiedene Phasen der Erkrankung erkennbar. Zu den frühen Manifestationen gehört ein einmalig oder mehrfach auftretender Ausschlag, der als Erythema migrans (EM) bezeichnet wird; in den folgenden Wochen und Monaten wird häufig ein Meningitis-Stadium beobachtet. In den späten Manifestationen treten Arthritis oder neurologische Anzeichen und Symptome auf. In asymptomatischen oder subklinischen Fällen treten möglicherweise erst in den späten Krankheitsstadien Infektionssymptome in Erscheinung (5).

Die Isolierung von Borrelien in einer Kultur ist ein definitiver Hinweis auf eine aktive Infektion, lässt sich aber schlecht praktizieren. Der Nachweis spezifischer Antikörper ist gut durchführbar, liefert aber nur einen indirekten Hinweis auf den Kontakt mit dem Erreger. Innerhalb weniger Wochen nach Erscheinen des EM bilden die Patienten IgM-Antikörper. Obwohl es möglich ist, dass im ersten Monat lediglich IgM-Antikörper nachweisbar sind, nimmt die Menge der IgG-Antikörper bei den meisten Patienten nach etwa einem Monat zu. Die Konzentrationen sowohl von IgG als auch von IgM können jahrelang auf nachweisbarem Niveau bleiben (5, 6).

Die Stämme von *Borrelia* zeigen eine beträchtliche Antigen-Variation. Die Patienten entwickeln oft frühe Antikörper gegen das Geißelantigen, welches kreuzreaktiv sein kann. Bei den Patienten, die sich im Frühstadium der Erkrankung befinden, und bei einem Teil der Patienten mit Spätmanifestationen sind möglicherweise keine Antikörper nachweisbar. Eine frühe antimikrobielle Behandlung nach Auftreten des EM kann zu verminderten Antikörperkonzentrationen führen. Es wurde gezeigt, dass serologische Tests über geringe Sensitivität und Spezifität verfügen und daher für die Diagnose einer Lyme-Borreliose nicht verlässlich sind (6, 7, 8).

Auf Empfehlung der Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme Disease (1994) ist für die Lyme-Serologie ein zweistufiges Testsystem zu verwenden, bei dem positive und nicht eindeutige Proben aus einem sensitiven Test der ersten Stufe mit einer spezifischeren Methode wie dem Western Blot (zweite Stufe) nochmals getestet werden müssen. Durch positive Ergebnisse des Tests der zweiten Stufe werden die Anhaltspunkte für einen Kontakt mit *B. burgdorferi* bekräftigt, was eine klinische Diagnose der Lyme-Borreliose stützen kann, aber nicht als Diagnosekriterium betrachtet werden darf (9).

II. PRINZIP

Beim EU-Lyme-Borreliose-IgG-Testsystem von Trinity Biotech handelt es sich um eine indirekte Enzym-Immunoassay (EIA)-Technik, bei der gereinigte native Antigene von *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des Proteins VlsE verwendet werden, die in Polystyren-Mikrowells gebunden sind. Der Antikörper aus der Patientenprobe, der im ersten Verfahrensschritt in die Mikrowells gegeben wird, wird an das Antigen gebunden. Nach einer Waschperiode, in der ungebundene Antikörper entfernt werden, wird jedem Mikrowell mit Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG hinzugefügt. Das Konjugat lagert sich im zweiten Inkubationsschritt nur dann an, wenn aus der Reaktion des ersten Schrittes genügend gebundene Human-IgG-Antikörper vorhanden sind. Nach einer zweiten Waschperiode, in der ungebundenes Peroxidase-Konjugat entfernt wird, wird eine Farbindikatorlösung in die Mikrowells gegeben, die nur bei Vorhandensein von gebundener Peroxidase reagiert. Nach einer bestimmten Zeit wird eine saure Lösung hinzugefügt, um die enzymatische Umwandlung der Indikatorlösung für die spektrophotometrische Analyse zu stoppen.

III. ENTHALTENE REAGENZIEN

Jedes Kit enthält die folgenden Komponenten in Mengen, die für die Durchführung der auf dem Packungsetikett angegebenen Anzahl von Tests ausreichen.

III. ENTHALTENE REAGENZIEN (Fortsetzung)

1. Mit gereinigten nativen Antigenen von *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE beschichtete Mikrotiterplatte: 96 Vertiefungen, als ganze Platte konfiguriert, in Folienbeutel mit Trockenmittel. Produktnummer 44-8208G
2. EU Lyme-EIA-IgG-Humanserum zur positiven Kontrolle. Proclin (0,1%) ist als Konservierungsmittel hinzugefügt. Produktnummer 44-8002, ein Fläschchen, 100 µl.
3. EU Lyme-EIA IgG-Humanserum, schwach positiv. Proclin (0,1%) ist als Konservierungsmittel hinzugefügt. Produktnummer 44-8003, ein Fläschchen, 100 µl.
4. EU Lyme EIA-Humanserum zur negativen Kontrolle Proclin (0,1%) ist als Konservierungsmittel hinzugefügt. Produktnummer 44-8001, ein Fläschchen, 100 µl.
5. Peroxidase-Konjugat, Anti-Human-IgG. Ziegen-Anti-Human-IgG, enthält Proclin (0,03%) als Konservierungsstoff. Produktnummer 44-8025G, eine Flasche, 13,5 ml.
6. EU-Lyme-EIA-Farbenentwickler: Tetramethylbenzidin (TMB). Produktnummer 44-1006, eine Flasche, 13,0 ml.
7. Stopplösung: Enthält eine H₃PO₄-Lösung. Produktnummer 40-1004, eine Flasche, 15 ml.
8. Serumverdünnungsmittel. Enthält Proclin (0,1%) als Konservierungsmittel. Produktnummer 40-8012, eine Flasche, 100 ml.
9. 10x Waschlösung. Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tween-20. Produktnummer 40-1013, eine Flasche, 100 ml.

IV. VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Zur *In-vitro*-Diagnostik.
2. Die in den Reagenzien enthaltenen Konservierungsstoffe sollten nicht verschluckt werden, da sie giftig sein können. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. Der Kit enthält 1-molare Phosphorsäure als Stopplösung. Saure Lösungen sollten mit guter Laborpraxis gehandhabt werden. Vermeiden Sie jeglichen Kontakt mit Haut, Augen oder Kleidung. Bereiche, die dem Stoff ausgesetzt waren, sollten mit reichlich Wasser gespült werden.
4. Die bei der Zubereitung der Kontrollen dieses Kits verwendeten Bestandteile aus Humanserum wurden nach einer von der FDA anerkannten Methode auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das humane Immundefizienzvirus 1 & 2 (HIV 1&2) sowie von Hepatitis C (HCV)- und Hepatitis B-Oberflächenantigenen getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein von HIV-, HCV- und Hepatitis B-Viren oder anderer Infektionsträger mit keiner Testmethode vollständig ausgeschlossen werden kann, sind die Proben und auf humanem Material basierenden Reagenzien als potenziell infektiöse Stoffe zu behandeln.
5. Nach Empfehlung der Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health sind potenziell infektiöse Materialien nach Biosicherheitsstufe 2 zu handhaben (10).
6. Weichen Sie nicht von den Temperatur- und Zeitvorgaben ab, die auf der Packungsbeilage für die Inkubations- und Waschschrte angegeben sind. Bei Abweichungen können die Testergebnisse erheblich verfälscht werden.
7. **Alle Reagenzien müssen vor der Durchführung des Testverfahrens auf eine Temperatur von +20 bis +25°C gebracht werden. Temperaturen, die über oder unter dem empfohlenen Bereich liegen, können eine wesentliche Änderung der Testergebnisse bewirken.**
8. Wenn Sie nicht die ganze Platte verwenden, ordnen Sie die Streifen in der Mitte des Plattenrahmens an, um sie während der Waschschrte zu sichern.
9. Tauschen Sie Kit-Komponenten einer Charge nicht durch Komponenten einer anderen Charge aus.
10. Alle nicht verwendeten Mikrowells müssen bis zum nächsten Gebrauch mit Trockenmittel bei +2 bis +8 C gelagert werden.
11. Vermeiden Sie Kreuzkontaminationen der Reagenzien. Waschen Sie sich vor und nach dem Umgang mit Reagenzien die Hände. Bei einer Kreuzkontamination von Reagenzien und/oder Proben können fehlerhafte Ergebnisse die Folge sein.

12. Die Vertiefungen müssen dreimal gewaschen werden.
13. Wenn eine Natriumhypochlorit-Lösung als Desinfektionsmittel eingesetzt wird, lassen Sie diese während des Tests nicht in den Arbeitsbereich gelangen, um Interferenzen mit der Enzymaktivität zu vermeiden.
14. Zur Erkennung von Antikörpern gegen *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* einschließlich des Proteins VlsE bestimmte Assays:
 - a. geben nicht an, wann die Exposition aufgetreten ist.
 - b. geben nicht an, ob eine aktive Replikation stattfindet oder nicht.
 - c. liefern häufig falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse.
 - d. spielen keine bewährte Rolle beim Antikörpernachweis in Serum, das während der Spätmanifestationen der Infektion gewonnen wurde.
 - e. weisen bei der klinischen Präsentation im Frühstadium der Lyme-Borreliose oftmals keine Antikörper nach, selbst dann nicht, wenn ein Erythema migrans vorliegt und die Isolierung von *Borrelia* in einer Kultur erreicht werden konnte.
15. Die Konzentration von Antikörpern gegen *Borrelia* in einer Probe kann bei Verwendung von Tests verschiedener Hersteller aufgrund von Unterschieden bei den Testmethoden und der Reagenz-Spezifität unterschiedlich ausfallen.
16. Mischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen Chargen und vertauschen Sie keine Mikrowells oder Platten aus IgG- und IgM-Kits.

V. LAGERUNG UND STABILITÄT

1. Kit bei +2 bis +8°C lagern.
2. Bringen Sie alle Komponenten vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
3. Beachten Sie das Haltbarkeitsdatum auf allen Reagenzien.
4. Beachten Sie das Haltbarkeitsdatum auf den Mikrowellstreifen.
5. Lagern Sie das Kit nach der Verwendung sofort wieder kühl.
6. Alle nicht verwendeten geöffneten Mikrowells müssen bis zum nächsten Gebrauch mit Trockenmittel bei +2 bis +8°C gelagert werden.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Mikroröhrchen.
2. Mikroröhrchenständer.
3. Lagerbehälter, 1,0 l, Kunststoff oder Glas.
4. Pipettoren mit einer Kapazität von 10 µl, 100 µl und 1,0 ml.
5. Pipettor, Kapazität 100 µl, 8 Kanäle (optional).
6. Abfallbehälter.
7. Timer, 30 Minuten.
8. Kunststoff-Quetschflasche, 500 ml.
9. Saugfähiges Papier (Papiertücher).
10. Destilliertes Wasser.
11. EIA-Plattenmessgerät mit 450-nm-Filter.
12. Trockenmittel-Lagerung für geöffnete Teststreifen.

VII. ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. Bereiten Sie die im Test zu verwendende 1X-Waschlösung aus der mitgelieferten 10X-Waschlösung zu. Wenn die 10X-Waschlösung aus dem Kühlschrank genommen wird, können nicht aufgelöste Salze vorhanden sein. Lassen Sie das Reagenz Raumtemperatur annehmen und schütteln Sie die Flasche, um die Salze aufzulösen. Geben Sie kein Reagenz aus, bis alle Salze aufgelöst sind.
2. Stellen Sie die 1X-Waschlösung her, indem Sie 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen destilliertem oder entionisiertem Wasser in einer sauberen Kunststoff-Quetschflasche verdünnen. Stellen Sie für jeden zu verwendenden Streifen mit 8 Vertiefungen mindestens 50 ml verdünnte Waschlösung her.
6. Der Farbenentwickler ist gebrauchsfertig.
7. Das Konjugat ist gebrauchsfertig.
8. Das Serumverdünnungsmittel ist gebrauchsfertig.

VIII. PROBENENTNAHME

Serologische Proben müssen unter aseptischen Bedingungen entnommen werden. Verhindern Sie durch schnelle Trennung des Serums vom Gerinnsel eine Hämolyse. Serum sollte bei +2 bis +8°C gelagert werden, wenn es innerhalb von 4 bis 7 Tagen analysiert wird. Wenn es bei mindestens -20°C eingefroren wird, kann es 3 bis 6 Monate lang aufbewahrt werden. Vermeiden Sie die Verwendung lipämischen und stark hämolytischen Serums. Wenn die Proben bei Umgebungstemperatur transportiert werden, wird der Zusatz eines Konservierungstoffes, wie z.B. 0,01% Thimerosal (Merthiolat) oder 0,1% Natriumazid, dringend empfohlen. Das NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) gibt Empfehlungen zur Lagerung von Blutproben (Approved Standard Procedure for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A2 1999) (11).

IX. VORBEREITUNG DER PROBEN UND KONTROLLEN

Auf jeder Mikrotiterplatte müssen eine positive Kontrolle, drei schwach positive Kontrollen, eine negative Kontrolle und ein Reagenzleerwert getestet werden. **Verdünnen Sie die Kontrollen des Kits bei jedem Durchlauf gleichzeitig mit den Patientenproben.** Das Reagenz für den Reagenzleerwert wird aus Serumverdünnungsmittel ohne Zugabe von Humanserum zubereitet. Bereiten Sie die Kontrollen und Patientenproben in entsprechend markierten Vorverdünnungsröhrchen wie folgt vor:

1. Geben Sie in jedes Röhrchen 1,0 ml Serumverdünnungsmittel.
2. Geben Sie von jedem Serum 10 µl in das entsprechende Röhrchen und mischen Sie gründlich.
3. Setzen Sie jedes Röhrchen in einen geeigneten Ständer.
4. Die Proben, Kontrollen und Kalibratoren sind nun im Verhältnis 1:100 verdünnt und zur Aufgabe auf die Borrelia-sensibilisierten Mikrotiterplatten bereit.

X. TESTVERFAHREN

1. Nehmen Sie die ganze Platte aus dem Folienbeutel. Wenn Sie nicht die ganze Platte verwenden, müssen die Streifen in der Mitte des Plattenrahmens angeordnet werden, um sie während der Waschschriffe zu sichern. Geben Sie nicht verwendete Streifen zurück in den Folienbeutel und versiegeln Sie diesen. Die nicht verwendeten Streifen müssen mit Trockenmittel bei +2 bis +8°C gelagert werden.
2. Geben Sie von jeder Kontrolle, jeder Probe und der Verdünnung für den Reagenzleerwert 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen und tragen Sie dies auf einem EIA-Arbeitsblatt ein.
3. Inkubieren Sie bei 20 bis 25°C für 30 Minuten.
4. Schlagen Sie den Inhalt der Vertiefungen aus. Füllen Sie jede Vertiefung mit Waschlösung.
5. Wiederholen Sie Schritt 4 zweimal. Tupfen Sie die Streifen auf saugfähigem Papier trocken.
6. Geben Sie 100 µl Konjugat in jede Vertiefung.
7. Inkubieren Sie bei 20 bis 25°C für 30 Minuten.
8. Wiederholen Sie die Schritte 4 und 5.
9. Geben Sie 100 µl Farbentwickler in jede Vertiefung.
10. Inkubieren Sie bei 20 bis 25°C für 15 Minuten. In den positiven Vertiefungen entwickelt sich eine blaue Färbung.
11. Geben Sie 100 µl Stopplösung in jede Vertiefung. Mischen Sie, indem Sie behutsam die Seite der Platte antippen, so dass die Stopplösung gleichmäßig verteilt wird. Erzeugen Sie keine Blasen. In den positiven Vertiefungen entwickelt sich eine gelbe Färbung.
12. Inkubieren Sie für 2 Minuten.
13. Lesen Sie die Teststreifen innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit einem EIA-Plattenmessgerät bei 450 nm ab.

XI. QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Analyse der Farbintensität wird ein Spektrophotometer oder ein werden. EIA-Plattenmessgerät mit einem 450-nm-Filter benötigt.

1. Lesen Sie die Platte bei 450 nm ab. Drucken Sie die Werte der optischen Dichte (OD₄₅₀) aus.

2. Runden Sie den OD-Wert der Vertiefung für den Reagenzleerwert auf 2 Dezimalstellen und subtrahieren Sie ihn von allen Test-OD-Werten. (0,795 = 0,80, 2,333 = 2,33).
3. Runden Sie alle Test-OD-Werte wie oben.
4. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte der drei Schwach-Positiv-Vertiefungen. Weicht der Leerwert der optischen Dichte in einer der drei Vertiefungen um mehr als 10% vom Mittelwert ab, ignorieren Sie diesen Wert und berechnen Sie den Mittelwert aus den restlichen beiden Vertiefungen. Weichen die OD-Werte der verbleibenden beiden Vertiefungen um mehr als 10% vom Mittelwert ab, sind die Testergebnisse ungültig und der Test muss wiederholt werden.
5. Um einen Lyme-Index-Wert (LIV) zu berechnen, dividieren Sie die optische Dichte der Probe durch den gerundeten Schwach-Positiv-Wert.
6. Der Assay wird als gültig und für die Auswertung geeignet betrachtet, wenn:
 - a. die positive Kontrolle einen Lyme-Index-Wert $\geq 1,50$ aufweist.
 - b. die negative Kontrolle einen Lyme-Index-Wert $< 0,50$ aufweist.
 - c. die schwach-positive Kontrolle eine optische Dichte zwischen 0,45 und 0,95 aufweist.
 - d. der Leerwert einen OD-Wert $< 0,175$ aufweist.

XII. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ein Lyme-Index-Wert von 1,0 oder höher sollte als Indiz für eine wahrscheinliche Exposition gegenüber *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und/oder *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE betrachtet werden.

XIII. AUSWERTUNG

Positiv: Lyme-Index $\geq 1,0$

Bei einem positiven Ergebnis handelt es sich um ein Indiz für eine wahrscheinliche Exposition gegenüber *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und/oder *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE. Das Ergebnis muss durch einen Test der zweiten Stufe ergänzt werden, der eine größere Spezifität für Antikörper gegen *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE aufweist, und darf erst nach Abschluss dieses zweiten Tests ausgewertet werden. Ein positives Ergebnis gibt keinen Hinweis auf den Zeitpunkt der Exposition.

Negativ: Lyme-Index $< 0,5$

Ein negatives Ergebnis weist darauf hin, dass es zum Zeitpunkt der Probennahme keine serologischen Anhaltspunkte für eine Exposition gegenüber *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und/oder *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE gegeben hat. Ein negatives Ergebnis darf nicht die Grundlage für einen Ausschluss von *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE als Ursache der Erkrankung bilden, besonders dann nicht, wenn das Blut innerhalb von 2 Wochen nach Ausbruch der Symptome entnommen wurde. Besteht starker Verdacht auf eine Lyme-Borreliose, sollte 2 bis 4 Wochen nach der ersten Probe eine zweite Probe entnommen und dann getestet werden.

Nicht eindeutig: Lyme-Index $\geq 0,5$ und $\leq 0,99$

Bei einem nicht eindeutigen Ergebnis handelt es sich um ein Indiz für eine mögliche Exposition gegenüber *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und/oder *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE. Das Ergebnis muss durch einen Test der zweiten Stufe ergänzt werden, der eine größere Spezifität für Antikörper gegen *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und *B. burgdorferi* (B 31) einschließlich des spezifischen Proteins VlsE aufweist, und darf erst nach Abschluss dieses zweiten Tests ausgewertet werden.

XIV. EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS (Fortsetzung)

1. Sera von Patienten mit anderen durch Spirochäten hervorgerufenen Erkrankungen, wie Syphilis, Frambösie, Pinta, Leptospirose und Rückfallfieber, können falsch-positive Ergebnisse liefern. Bei Sera von Patienten mit Mononukleose oder Lupus erythematosus können sich ebenfalls falsch-positive Resultate ergeben. Falsch-positive Ergebnisse müssen klinisch, epidemiologisch und mit weiteren Labortests aufgearbeitet werden. Obwohl sich aktive Syphilis und Lyme-Borreliose klinisch stark unterscheiden, bilden VDRL- und RPR-Tests ein einfaches Mittel zur Differenzierung dieser beiden Erkrankungen. Bei aktiver Syphilis liefern VDRL und RPR positive, bei der Lyme-Borreliose negative Ergebnisse.
2. Bei Patienten in den frühen Stadien der Lyme-Borreliose ergibt dieser Test möglicherweise keine positiven Ergebnisse. In der frühen klinischen Phase des Erythema migrans haben die IgG-Antikörper unter Umständen noch keine nachweisbaren Konzentrationen erreicht. Negative Ergebnisse im Frühstadium der Erkrankung haben geringen Vorhersagewert.
3. Verwenden Sie zum Test auf eine Infektion der frühen Phase I ein Reagenzsystem für den Nachweis von IgM-Antikörpern, das keine Interferenzen durch den Rheumafaktor und IgG-Antikörper aufweist.
4. Eine Behandlung mit Antibiotika im Anfangsstadium der Erkrankung kann die Entwicklung einer Antikörperantwort verhindern.
5. Bei der Bewertung aller Testergebnisse müssen auch die Anamnese des Patienten, sein eventueller Aufenthalt in für Lyme-Borreliose endemischen Gebieten, epidemiologische Daten, weitere Testergebnisse sowie eventuelle weitere spirochätische Erkrankungen berücksichtigt werden. Bei Patienten, deren Anamnese keine Lyme-Borreliose oder mit dieser konsistente Symptome oder klinische Daten aufweist, sind positive Testergebnisse von geringem Vorhersagewert.
6. Positive oder mehrdeutige Testergebnisse der ersten Stufe dürfen nicht ausgewertet werden, bevor die Probe in einer zweiten Teststufe mit einer spezifischeren Methode, wie dem Western Blot, erneut getestet wurde.
7. Die Verwendung dieses Tests wurde nicht für Personen evaluiert, die gegen Lyme-Borreliose geimpft wurden.

XV. ERWARTETE WERTE

Bei Patienten ohne gegenwärtige oder vergangene Infektion mit *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) und/oder *B. burgdorferi* (B 31) sollten sich negative Testresultate ergeben, außer bei Patienten mit kreuzreagierenden Antikörpern (siehe Einschränkungen).

Bei Patienten mit Lyme-Borreliose sind die Testergebnisse vom Stadium der Erkrankung abhängig. IgG-Antikörper-Titer können innerhalb von zwei bis drei Wochen nach Ausbruch der Krankheit nachgewiesen werden. Das Protein VlsE stellt einen sehr frühen Marker für eine IgG-Immunantwort dar. Antikörper gegen VlsE können weiterbestehen. Mit Fortschreiten der Erkrankung nimmt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses zu. Patienten, die sich innerhalb von 3 Wochen nach Ausbruch des EM vorstellen, sind zu annähernd 25% IgG-positiv. Personen mit Symptomen des zweiten Stadiums sind fast immer positiv, ebenso Personen mit Symptomen des dritten Stadiums.

Für den Nachweis einer vorhandenen oder stattgefundenen Lyme-Borreliose ist der IgG-Test am sinnvollsten. Für den frühen Nachweis wird ein Test empfohlen, der die IgG-Antwort auf das Protein VlsE oder auf Antikörper der Klasse IgM nachweist. Die Zahl der IgM-Antikörper steigt nach der Infektion rasch an, erreicht innerhalb von 3 Wochen ihren Höchststand und nimmt dann schnell ab. Die Zahl der IgG-Antikörper beginnt 2 bis 3 Wochen nach der Infektion zu steigen, bleibt bestehen, solange die Symptome vorhanden sind, und fällt in der Erholungsphase langsam ab (5,6).

XVI. SPEZIELLE LEISTUNGSDATEN**Spezifität**

Die Spezifität von Trinity Biotech-IgG wurde in einem unabhängigen Diagnoselabor in England geprüft. Die Studie wurde auf einem Panel mit 100 Serumproben durchgeführt, die von vermutlich gesunden

Spendern entnommen wurden, die in einem für Lyme-Borreliose endemischen Bereich leben.

Relative Spezifität: 98% (98/100)

Sensitivität

Die Studie wurde auf drei Panels mit Serumproben von Patienten mit einigen der häufigsten klinischen Hinweise auf eine Borrelieninfektion durchgeführt: 55 Serumproben stammten von Patienten mit Erythema migrans, 30 von Patienten mit Arthritis und 40 von Patienten mit Neuroborreliose.

	Diagnostische Sensitivität von IgG	Diagnostische Sensitivität beide IgG und IgM
Erythema migrans	9 aus 55 84%	8 aus 55 88.5%
Arthritis	3 aus 30 90%	2 aus 30 93%
Neuroborreliose	1 aus 40 97.5%	0 aus 40 100%

Kreuzreaktivität

Sera von Patienten mit Syphilis, Entzündungskrankheiten (mit positivem rheumatoidem Faktor), Autoimmunität sowie Toxoplasma gondii wurden mit den folgenden Ergebnissen in IgG von Trinity Biotech getestet:

Patientensera	Anzahl der Sera	Anzahl positiver Ergebnisse
Syphilis	20	2
RF	20	1
Autoimmunität	20	0
Toxoplasma gondii	20	0

XVII. REPRODUZIERBARKEIT**Inter-Assay**

Probe	Mittelwert	SD	% VK
1	0,070	0,008	11,7
2	3,893	0,172	4,4
3	2,400	0,164	6,8
4	3,537	0,167	4,7
5	0,423	0,053	12,5
6	3,063	0,144	4,7

Intra-Assay

Probe	Mittelwert	SD	VK
1	0,084	0,010	12,0
2	3,671	0,245	6,7
3	2,304	0,069	3,0
4	3,166	0,274	8,7
5	0,413	0,036	8,7
6	2,924	0,098	3,4

XVIII. LITERATUR

17. Steere et.al. 1986. J. Infect. Dis. 154(2): 295-300.
18. Steere et.al. 1977. Arthritis Rheumatism. 20(1): 7-17.
19. Steere et.al. 1983. N.E.J.M. 308(13): 733-740.
20. Burgdorfer et.al. 1982. Science. 216: 317-1319.
21. Barbour et.al. 1988. Clin. Microbiol. Rev. 1(4): 399-411.
22. Agüero-Rosenfeld et.al. 1993. J. Clin. Microbiol. 31(12): 3090-3095.
23. Magnarelli et.al. 1987. J. Infect. Dis. 156(1): 183-188.
24. Bakken et.al. 1997. J. Clin Microbiol. 35(3):537-543.
25. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Morbid. Mortal.Weekly Rep. 44:590-591.
26. CDC/NIH Guidelines. 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd Ed. pp 9-12. USHHS, PHS.
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Publication H18-A2.

Kit per test EIA IgG Lyme EU + VlsE

Kit immunoenzimatico (EIA) IgG Lyme EU + VlsE per la rilevazione di anticorpi IgG anti-*Borrelia afzelii*(PKO), *Borrelia garinii*(G2) e *Borrelia burgdorferi*(B31) inclusa la proteina VlsE

Codice prodotto 44-8696G

96 determinazioni

Conservare il kit a una temperatura compresa tra +2 a +8°C

CAMPO DI UTILIZZO

Il kit immunoenzimatico (EIA) IgG Lyme EU + VlsE di Trinity Biotech è un test qualitativo utilizzabile per la rilevazione presuntiva degli anticorpi IgG umani anti-*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* e *Borrelia burgdorferi*(B-31) inclusa la proteina VlsE nel siero umano. Questo kit per test immunoenzimatico deve essere utilizzato per analizzare il siero di pazienti con anamnesi e sintomi di infezione da *Borrelia*. Tutti i campioni positivi e dubbi devono essere rianalizzati con un test di secondo livello più specifico, come il Western Blot. I risultati positivi di un test di secondo livello devono essere considerati indicativi di infezione da *Borrelia*. Per la diagnosi di malattia di Lyme è necessario considerare l'anamnesi e i sintomi (quali l'eritema migrans), nonché altri dati di laboratorio, oltre alla presenza di anticorpi anti-*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* e *B. burgdorferi*(B-31) inclusa la proteina VlsE. Non utilizzare i risultati negativi, sia di primo che di secondo livello, per escludere una diagnosi di malattia di Lyme.

I. SOMMARIO

La borreliosi di Lyme è una malattia multisistemica causata dalla spirochete *Borrelia burgdorferi* (1). La malattia è stata documentata in Europa agli inizi di questo secolo, ma è stata descritta per la prima volta in forma epidemica negli Stati Uniti nel 1975 in bambini dell'Old Lyme Connecticut che mostravano sintomi artrici. Steere, et al. hanno poi riconosciuto la malattia come singola entità clinica (2,3). I sintomi della borreliosi di Lyme sono stati confusi con quelli di molte altre malattie, tra cui artrite reumatoide giovanile, lupus eritematoso, sclerosi multipla, paralisi di Bell, febbre reumatica, sindrome di Reiter, miocardite e meningite virale (4). I ceppi predominanti presenti in Europa sono quelli di *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* e *Borrelia burgdorferi*.

La spirochete si trasmette tramite il morso della zecca *Ixodes* presente negli abbeveratoi di animali quali cervi, gatti, cani, cavalli e uccelli. Le zecche sono in genere presenti sulla vegetazione di regioni endemiche, in particolare nelle aree boschive comunemente adibite ad abbeveratoio per animali. L'incidenza dell'infezione umana coincide con la stagione delle zecche, ovvero da maggio a settembre (3,5).

Sebbene i sintomi della borreliosi di Lyme siano variabili e talvolta poco evidenti, è facile riconoscere tre fasi distinte della malattia. I prodromi includono uno o più rash, detti eritema migrans (EM), accompagnati da meningite nelle settimane o mesi successivi. Tra le manifestazioni tardive sono state riscontrate artrite o segni e sintomi neurologici. Nei casi asintomatici o subclinici, i sintomi dell'infezione possono non risultare evidenti fino alle ultime fasi della malattia (5).

L'isolamento della *B. species* in coltura costituisce la prova definitiva di infezione attiva, ma non risulta pratico. La rilevazione di anticorpi specifici è invece pratica ma rappresenta un'indicazione indiretta di esposizione. I pazienti iniziano a produrre anticorpi IgM entro poche settimane dalla comparsa dell'eritema migrans. Sebbene nel primo mese siano rilevabili solo gli anticorpi IgM, il numero di anticorpi IgG aumenta nella maggior parte dei pazienti nel giro di circa un mese. Livelli rilevabili di anticorpi IgG e IgM possono persistere per anni (5,6).

I ceppi di *Borelia* mostrano notevoli variazioni antigeniche. I pazienti sviluppano spesso anticorpi precoci all'antigene flagellare che può presentare cross-reattività. I pazienti nelle fasi iniziali della malattia e una parte di pazienti con manifestazioni tardive possono non presentare anticorpi rilevabili. Un trattamento antimicrobico precoce, dopo la comparsa dell'eritema migrans, può portare a una diminuzione delle concentrazioni di anticorpi. Test sierologici hanno dimostrato scarsa sensibilità e specificità, pertanto non possono essere considerati affidabili per la diagnosi della borreliosi di Lyme (6,7,8).

Nella seconda conferenza nazionale sulla diagnosi sierologica della borreliosi di Lyme (1994) è stato raccomandato l'uso di un kit di test a due livelli per la sierologia di Lyme, che preveda l'analisi dei campioni risultati positivi e dubbi a un test sensibile di primo livello con un metodo più specifico quale il test Western Blot di secondo livello. I risultati positivi di un test di secondo livello devono essere considerati come indicativi di infezione da *B. burgdorferi* e possono quindi essere utilizzati come supporto per la diagnosi clinica della borreliosi di Lyme, ma non come criterio per la diagnosi (9).

II. PRINCIPIO

Il kit immunoenzimatico IgG per la malattia di Lyme EU di Trinity Biotech è basato su una tecnica indiretta di test immunoenzimatico (EIA) che prevede l'uso di antigeni nativi purificati di *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica, associati a micropozzetti di polistirolo. L'anticorpo presente nel campione del paziente, aggiunto ai micropozzetti nella prima parte della procedura, si lega all'antigene. Dopo una fase di risciacquo per rimuovere l'anticorpo non legato, in ciascun micropozzetto viene aggiunta perossidasi marcata con IgG antiumano. Il coniugato si lega durante la seconda fase di incubazione solo se l'anticorpo IgG umano legato è presente nella reazione della prima fase. In seguito a una seconda fase di risciacquo per rimuovere il coniugato di perossidasi non legato, nei micropozzetti viene aggiunta una soluzione con indicatore a colori che reagisce solo in presenza di perossidasi legata. Dopo un intervallo specificato viene aggiunta una soluzione acida per arrestare la conversione enzimatica della soluzione con indicatore ed eseguire l'analisi spettrofotometrica.

III. REAGENTI FORNITI

Ogni kit contiene i seguenti componenti in quantità sufficiente ad eseguire il numero di test indicato sull'etichetta della confezione.

1. Micropiastra sensibilizzata con antigeni nativi purificati di *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica: 96 pozzetti, configurati in piastra completa, conservati in un sacchetto d'alluminio con essiccante. Codice prodotto 44-8208G
2. Controllo positivo test immunoenzimatico IgG *Lyme EU*: siero umano. Contiene proclin (0,1%), come conservante. Codice prodotto 44-8002, una fiala da 100 µl.
3. Controllo positivo per valori bassi test immunoenzimatico IgG *Lyme EU*: siero umano. Contiene proclin (0,1%), come conservante. Codice prodotto 44-8003, una fiala da 100 µl.
4. Controllo negativo per test immunoenzimatico *Lyme EU*: siero umano. Contiene proclin (0,1%), come conservante. Codice prodotto 44-8001, una fiala da 100 µl.
5. Coniugato perossidasi IgG anti-umano da capra, contenente proclin (0,03%) come conservante. Codice prodotto 44-8025G, un flacone da 13,5 ml.
6. Sviluppatore di colore per test immunoenzimatico *Lyme EU*: tetrametilbenzidina (TMB). Codice prodotto 44-1006, un flacone da 13,0 ml.
7. Soluzione di bloccaggio: contiene una soluzione a base di H₃PO₄. Codice prodotto 40-1004, un flacone da 15 ml.
8. Diluente del siero. Contiene proclin (0,1%), come conservante. Codice prodotto 40-8012, un flacone da 100 ml.
9. Soluzione di lavaggio 10X. Contiene PBS, Tween-20. Codice prodotto 40-1013, un flacone da 100 ml.

IV. PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico *in vitro*.
2. I conservanti utilizzati nei reagenti possono essere tossici se ingeriti. Non pipettare con la bocca.
3. Il kit contiene 1 molare di acido fosforico come soluzione di bloccaggio. Attenersi a corrette pratiche di laboratorio per l'uso di soluzioni acide. Evitare il contatto con pelle, occhi o abbigliamento. Sciacquare abbondantemente con acqua le aree esposte.
4. I componenti del siero umano utilizzati nella preparazione dei controlli presenti in questo kit sono stati testati utilizzando un metodo approvato dalla FDA e sono risultati negativi alla presenza di anticorpi HIV di tipo I e II, dell'epatite C (HCV), nonché degli antigeni superficiali dell'epatite B. Poiché nessun metodo può garantire l'assenza del virus dell'HIV, dell'HCV e dell'epatite B o di altri agenti infettivi, i campioni ed i reagenti basati su prodotti di origine umana devono essere trattati come potenziale fonte di trasmissione di agenti infettivi.
5. Il Center for Disease Control and Prevention (Centro per il Controllo e la Prevenzione della Malattia) ed il National Institute of Health (Istituto Nazionale della Sanità) raccomandano l'adozione delle precauzioni previste dal livello di biosicurezza 2 durante l'uso di agenti potenzialmente infettivi (10).
6. Attenersi alle temperature e ai tempi riportati nel foglietto illustrativo del kit per le fasi di incubazione e di lavaggio. La mancata osservanza di tali requisiti può alterare i risultati del test.
7. **Tutti i reagenti devono essere portati a una temperatura tra +20 a -25°C prima di eseguire il test. Temperature inferiori o superiori al range consigliato possono alterare significativamente i risultati del test.**
8. Se non si intende utilizzare una piastra completa, centrare le strip nella cornice della piastra in modo da tenerle bloccate durante le operazioni di lavaggio.
9. Non utilizzare i componenti di un lotto di kit per un altro lotto di kit.
10. Tutti i micropozzetti inutilizzati devono essere conservati in essiccante a una temperatura compresa tra +2 a +8°C.

11. Evitare la contaminazione incrociata dei reagenti. Lavarsi le mani prima e dopo aver manipolato reagenti. La contaminazione incrociata di reagenti e/o campioni può causare risultati falsi.
12. I pozzetti devono essere lavati per tre volte.
13. Quando si utilizza come disinfettante una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina), non esporre l'area di lavoro durante l'effettiva procedura del test per evitare potenziali interferenze con l'attività dell'enzima.
14. I dosaggi previsti per la rilevazione degli anticorpi anti-*Borrelia Afzelii*, *Borrelia Garinii* e *Borrelia burgdorferi* inclusa la proteina VlsE:
 - a. non consentono di ottenere indicazioni temporali sull'esposizione;
 - b. non consentono di ottenere indicazioni sull'eventuale possibilità di replica attiva;
 - c. danno spesso risultati falsi positivi e falsi negativi;
 - d. non sono pertinenti nella rilevazione di tali anticorpi nel siero raccolto durante le manifestazioni tardive dell'infezione;
 - e. non consentono spesso di rilevare anticorpi nelle fasi iniziali della borreliosi di Lyme, anche in presenza di eritema migrans e in caso di isolamento della *Borrelia species* in coltura.
15. Le concentrazioni di anticorpo anti-*Borrelia* in un dato campione, determinate con test di diversi produttori, possono variare a causa di differenze nei metodi di analisi e nella specificità dei reagenti.
16. Non miscelare componenti con diverso numero di lotto e non scambiare micropozzetti o piastre appartenenti a kit IgG e IgM.

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Conservare il kit a una temperatura compresa tra +2 a +8°C.
2. Prima dell'uso portare tutti i componenti a temperatura ambiente.
3. Controllare la data di scadenza riportata su tutti i reagenti.
4. Controllare la data di scadenza riportata sulle strip dei micropozzetti.
5. Riporre immediatamente il kit in frigorifero dopo l'uso.
6. Tutti i micropozzetti aperti inutilizzati devono essere conservati in essiccante a una temperatura compresa tra +2 a +8°C.

VI. MATERIALE AGGIUNTIVO NECESSARIO NON FORNITO

1. Microprovette
2. Portaprovette
3. Contenitore da 1 l di plastica o vetro
4. Pipettatori da 10 µl, 100 µl e 1 ml
5. Pipettatori da 100 µl a 8 canali (facoltativo)
6. Contenitore per rifiuti
7. Cronometro da 30 minuti
8. Spruzzetta in plastica da 500 ml
9. Fazzoletti di carta assorbente
10. Acqua distillata
11. Lettore di piastre EIA con filtro a 450 nm
12. Essiccante per la conservazione di strip di micropozzetti aperte

VII. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Preparare una soluzione di lavaggio 1X dalla soluzione 10X fornita. Nella soluzione di lavaggio 10X conservata in frigorifero potrebbero essere presenti sali non disciolti. Lasciare che il reagente raggiunga la temperatura ambiente e agitare il flacone in modo da disciogliere i sali. Non utilizzare il reagente finché tutti i sali non risultano disciolti.
2. Per preparare la soluzione di lavaggio 1X, diluire una parte del concentrato con 9 parti di acqua distillata o deionizzata in una spruzzetta di plastica pulita. Per ciascuna strip da 8 pozzetti da utilizzare preparare almeno 50 ml di soluzione di lavaggio diluita.
3. Lo sviluppatore di colore è pronto per l'uso.
4. Il coniugato è pronto per l'uso.
5. Il diluente del siero è pronto per l'uso.

VIII. CAMPIONAMENTO

I campioni sierologici devono essere raccolti in condizioni asettiche. Evitare l'emolisi separando immediatamente il siero dal coagulo. Conservare il siero a una temperatura compresa tra 2 e 8°C se deve essere analizzato entro 4-7 giorni. Il siero può essere conservato per 3-6 mesi se tenuto ad una temperatura pari o inferiore a -20°C. Evitare sieri lipemici o fortemente emolitici. Quando i campioni vengono inviati al laboratorio a temperatura ambiente, è vivamente consigliata l'aggiunta di conservanti quali timerosal allo 0,01% (mertiolato) o sodio azide allo 0,1%. Il NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, Comitato Nazionale per gli Standard dei Laboratori Clinici) fornisce indicazioni per la conservazione dei campioni di sangue (Approved Standard Procedure for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A2 1999).(11)

IX. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E DEI CONTROLLI

In ogni micropiastra analizzata devono essere utilizzati un controllo positivo, tre controlli positivi per valori bassi, un controllo negativo e un bianco. **Diluire i controlli contemporaneamente ai campioni da paziente.** Per ottenere il bianco, utilizzare il diluente del siero senza aggiungere siero umano. Preparare i controlli e i campioni da paziente in provette di prediluizione appositamente contrassegnate, come descritto di seguito:

1. Aggiungere 1,0 ml di diluente del siero in ciascuna provetta.
2. Aggiungere 10 µl di ciascun siero nella provetta appropriata e miscelare accuratamente.
3. Inserire tutte le provette in un apposito portaprovette.
4. Campioni, controlli e calibratori sono ora diluiti 1:100 e pronti per l'applicazione su micropiastre sensibilizzate per l'anticorpo anti-Borrelia.

X. PROCEDURA DEL TEST

1. Estrarre la piastra completa dal sacchetto di alluminio. Se non si intende utilizzare una piastra completa, centrare le strip nella cornice della piastra in modo da tenerle bloccate durante le operazioni di lavaggio. Reinscrivere le strip inutilizzate nel sacchetto di alluminio e risigillare accuratamente. Le strip inutilizzate devono essere conservate in essiccante a una temperatura compresa tra +2 a +8°C.
2. Aggiungere 100 µl della diluizione di ciascun controllo, campione e bianco nei pozzetti e prendere nota nel foglio di lavoro EIA.
3. Incubare a 20-25°C per 30 minuti.
4. Agitare il contenuto dei pozzetti. Riempire ciascun pozzetto con la soluzione di lavaggio.
5. Ripetere il lavaggio altre due volte. Asciugare le strip su carta assorbente.
6. Aggiungere 100 µl di coniugato in ogni pozzetto.
7. Incubare a 20-25°C per 30 minuti.
8. Ripetere le operazioni descritte ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100 µl di sviluppatore di colore in ogni pozzetto.
10. Incubare a 20-25°C per 15 minuti. I pozzetti positivi svilupperanno una colorazione blu.
11. Aggiungere 100 µl di soluzione di bloccaggio in ogni pozzetto. Miscelare picchiando delicatamente il bordo della piastra per consentire una dispersione uniforme della soluzione di bloccaggio. Evitare la creazione di bolle. I pozzetti positivi svilupperanno una colorazione gialla.
12. Incubare per 2 minuti.
13. Leggere le strip di test con un lettore di piastre EIA a 450 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di bloccaggio.

XI. CONTROLLO QUALITÀ

Per l'analisi dell'intensità del colore è necessario disporre di uno spettrofotometro o di un lettore di piastre EIA con filtro a 450 nm.

1. Leggere la piastra a 450 nm. Prendere nota dei valori di densità ottica (OD₄₅₀).

2. Arrotondare la densità ottica del pozzetto del bianco a 2 cifre a destra della virgola decimale e sottrarre il risultato da tutti i valori di densità ottica del test. (0,795 = 0,80, 2,333 = 2,33).
3. Arrotondare tutti i valori di densità ottica del test come descritto in precedenza.
4. Calcolare la densità ottica media dei tre pozzetti del controllo positivo valori bassi. Se in uno dei tre pozzetti viene riscontrato uno scostamento superiore al 10% rispetto al valore medio della densità ottica, scartare tale valore e calcolare la media dei due pozzetti restanti. Se i valori di densità ottica degli altri due pozzetti presentano anch'essi uno scostamento del 10% rispetto alla media, i risultati non sono validi ed è necessario ripetere il test.
5. Per calcolare il valore dell'indice Lyme (LIV), dividere il valore della densità media del campione per il valore medio della densità ottica del controllo positivo per valori bassi.
6. Il test viene considerato valido e significativo quando:
 - a. Il controllo positivo presenta un valore dell'indice Lyme $\geq 1,50$.
 - b. Il controllo negativo presenta un valore dell'indice Lyme $< 0,50$.
 - c. Il controllo positivo per valori bassi presenta un valore della densità ottica pari a 0,45-0,95.
 - d. Il bianco presenta un valore della densità ottica $< 0,175$.

XII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Un valore dell'indice Lyme pari o superiore a 1,0 deve essere considerato indicativo di esposizione alla *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e/o *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica.

XIII. REFERTAZIONE

Positivo - Indice Lyme $\geq 1,0$

Un risultato positivo è indicativo di esposizione alla *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e/o *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica. Il risultato deve essere confermato da un test di secondo livello più specifico per gli anticorpi anti-*Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica e non deve essere riportato fino al completamento del test di secondo livello. Un risultato positivo non fornisce indicazioni temporali sull'esposizione.

Negativo - Indice Lyme $< 0,5$

Non sono stati rilevati anticorpi anti-*B. burgdorferi*. Un risultato negativo indica l'assenza di prove sierologiche di esposizione alla *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e/o *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica al momento in cui è stato prelevato il campione. Non deve quindi essere utilizzato per escludere la *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica come causa dello stato patologico, in particolare se il campione di sangue è stato prelevato entro due settimane dall'inizio dei sintomi. Se si sospetta che i sintomi siano associati alla malattia di Lyme, prelevare un secondo campione 2-4 settimane dopo il primo ed analizzarlo.

Dubbio - Indice Lyme $\geq 0,5$ e $\leq 0,99$

Un risultato dubbio è indicativo di una possibile esposizione alla *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e/o *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica. Il risultato deve essere confermato da un test di secondo livello più specifico per gli anticorpi anti-*Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) and *B. burgdorferi* (B 31) inclusa la proteina VlsE specifica e non deve essere riportato fino al completamento del test di secondo livello.

XIV. LIMITI DELLA PROCEDURA

1. I sieri di pazienti affetti da altre malattie causate da spirochete, quali sifilide, framboesia, spirochetosi discromica, leptospirosi e febbre ricorrente possono dare falsi risultati positivi. Anche i sieri di pazienti affetti da mononucleosi o lupus eritematoso possono dare falsi risultati positivi. In caso di falsi risultati positivi, è opportuno effettuare indagini diagnostiche cliniche, epidemiologiche e di laboratorio. Sebbene il quadro clinico della sifilide attiva sia completamente diverso da quello della malattia di Lyme, un metodo semplice e rapido per distinguere le due malattie prevede l'uso di test VDRL o RPR. Nella sifilide attiva i valori di VDRL o RPR sono positivi. Nella malattia di Lyme gli stessi valori sono negativi.
2. Questo test potrebbe non evidenziare positività in pazienti nelle fasi iniziali della malattia. I livelli degli anticorpi IgG tipici della fase iniziale della malattia (eritema mutans) potrebbero infatti risultare ancora non rilevabili. Risultati negativi nelle fasi iniziali hanno dunque scarso valore predittivo.
3. Per i test nelle fasi iniziali dell'infezione, utilizzare un sistema di reagenti in grado di rilevare l'anticorpo IgM e che non vengano influenzati da anticorpi IgG e fattore reumatoide.
4. Una terapia antibiotica somministrata nelle fasi iniziali della malattia può impedire lo sviluppo di una risposta degli anticorpi.
5. La valutazione di tutti i risultati di test deve includere l'anamnesi del paziente, l'esposizione del paziente in regioni endemiche associate alla malattia di Lyme, i dati epidemiologici, i risultati di altri test ed eventuali altre malattie causate da spirochete. I risultati positivi di pazienti che non presentano in anamnesi un'esposizione alla malattia di Lyme oppure l'insorgere di sintomi o rilevazioni cliniche comunemente associate a tale malattia possono avere scarso valore predittivo.
6. Risultati positivi o dubbi ottenuti con test di primo livello devono essere riportati solo dopo aver eseguito un test di secondo livello sul campione utilizzando un metodo più specifico, quale il Western Blot.
7. L'uso di questo test non è ancora stato valutato su individui vaccinati contro la malattia di Lyme.

XV. VALORI ATTESI

In pazienti che non presentano infezioni passate o presenti da *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) e/o *B. burgdorferi* (B 31), i risultati del test devono essere negativi ad eccezione dei pazienti con anticorpi cross-reattivi (vedere la sezione Limiti).

In pazienti affetti da borreliosi di Lyme i risultati del test dipendono dalla fase della malattia. I titoli dell'anticorpo IgG sono rilevabili entro due-tre settimane dalla comparsa della malattia. La proteina VlsE è un indicatore molto precoce della risposta immunitaria degli anticorpi IgG ed è possibile che gli anticorpi alla VlsE persistano. Col progredire della malattia aumentano le possibilità di test positivo. Gli individui sottoposti a test entro tre settimane dalla comparsa dell'eritema mutans risultano positivi all'anticorpo IgG in circa il 25% dei casi. Gli individui che presentano i sintomi tipici della seconda fase sono quasi sempre positivi, così come quelli con sintomi della terza fase.

Il test IgG è utile soprattutto per la rilevazione di casi passati o in corso della malattia di Lyme. Per una rilevazione precoce, si consiglia un test in grado di individuare la risposta degli anticorpi IgG alla proteina VlsE o la presenza di anticorpi di classe IgM. Gli anticorpi IgM aumentano immediatamente dopo l'infezione, raggiungendo il picco entro tre settimane, quindi diminuiscono rapidamente. Gli anticorpi IgG iniziano ad aumentare due-tre settimane dopo l'infezione e persistono in presenza dei sintomi, diminuendo lentamente durante la guarigione (5,6).

XVI. PRESTAZIONI**Specificità**

La specificità dell'IgG di Trinity Biotech è stata valutata presso un laboratorio diagnostico indipendente in Inghilterra. Lo studio è stato effettuato su un pannello di 100 campioni di siero prelevati da donatori presumibilmente sani provenienti da un'area endemica per la borreliosi di Lyme.

Specificità relativa del 98% (98/100)

Sensibilità

Lo studio è stato condotto su tre pannelli di campioni di siero prelevati a pazienti con alcune delle manifestazioni cliniche più comuni di infezione da Borrelia: 55 campioni di siero da pazienti con eritema migrans, 30 campioni di siero da pazienti con artrite e 40 campioni di siero da pazienti con neuroborreliosi.

	Sensibilità diagnostica per la IgG	Sensibilità diagnostica tra anticorpi IgG e IgM
Eritema migrans	9 e fuori 55 84%	8 e fuori 55 85.5%
Artrite	3 e fuori 30 90%	2 e fuori 30 93%
Neuroborreliosi	1 e fuori 40 97.5%	0 e fuori 40 100%

Cross-reattività

Il test immunoenzimatico IgG di Trinity Biotech è stato utilizzato per analizzare campioni di siero prelevati a pazienti affetti da sifilide, patologie infiammatorie (fattore reumatoide (RF) positivo), autoimmunitarie e toxoplasma gondii, con i seguenti risultati:

Siero del paziente	Numero di sieri	Numero di positivi
Sifilide	20	2
RF	20	1
Autoimmune	20	0
Toxoplasma gondii	20	0

XVII. RIPRODUCIBILITÀ**Intertest**

Campione	Media	DS	% CV
1	0,070	0,008	11,7
2	3,893	0,172	4,4
3	2,400	0,164	6,8
4	3,537	0,167	4,7
5	0,423	0,053	12,5
6	3,063	0,144	4,7

Intratest

Campione	Media	DS	CV
1	0,084	0,010	12,0
2	3,671	0,245	6,7
3	2,304	0,069	3,0
4	3,166	0,274	8,7
5	0,413	0,036	8,7
6	2,924	0,098	3,4

XVIII. BIBLIOGRAFIA

13. Steere et.al. 1986. J. Infect. Dis. 154(2): 295-300.
14. Steere et.al. 1977. Arthritis Rheumatism. 20(1): 7-17.
15. Steere et.al. 1983. N.E.J.M. 308(13): 733-740.
16. Burgdorfer et.al. 1982. Science. 216: 317-1319.
17. Barbour et.al. 1988. Clin. Microbiol. Rev. 1(4): 399-411.
18. Agüero-Rosenfeld et.al. 1993. J. Clin. Microbiol. 31(12): 3090-3095.
19. Magnarelli et.al. 1987. J. Infect. Dis. 156(1): 183-188.
20. Bakken et.al. 1997. J. Clin Microbiol. 35(3):537-543.
21. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 44:590-591.
22. CDC/NIH Guidelines. 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd Ed. pp 9-12. USHHS, PHS.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Publication H18-A2.

Sistema de análisis por EIA EU Lyme + VlsE IgG

Sistema de enzimoanálisis (EIA) EU Lyme + VlsE IgG para la detección de anticuerpos IgG contra *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *Borrelia burgdorferi* (B31) incluida la proteína VlsE

Ref. 44-8696G

**96 Determinaciones
Mantenga el kit a +2° C a +8° C**

USO PREVISTO

El sistema de enzimoanálisis (EIA) EU Lyme + VlsE IgG de *Trinity Biotech* es una prueba cualitativa diseñada para su uso en la detección en suero humano de presuntos anticuerpos IgG humanos contra *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* y *Borrelia burgdorferi*(B-31), incluida la proteína VlsE. Este sistema de EIA debe ser utilizado para analizar sueros de pacientes con antecedentes y síntomas de infección por *Borrelia*. Todas las muestras positivas y dudosas deben ser reanalizadas con una prueba muy específica y de segundo nivel (confirmación), como *Western blot*. Si los resultados del segundo nivel son positivos, respaldan el diagnóstico de infección por *Borrelia*. Pero éste se basará en los antecedentes y los síntomas (como el eritema migratorio) y otros datos de laboratorio, además de la presencia de anticuerpos contra *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* y *B. burgdorferi*(B-31) incluida la proteína VlsE. Los resultados negativos (del primer o del segundo nivel) no sirven para descartar la enfermedad de Lyme.

I. RESUMEN

La enfermedad de Lyme afecta a varios sistemas y es causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (1). La enfermedad ha sido documentada en Europa desde el principio del siglo pasado. Apareció en los Estados Unidos en una epidemia en 1975 en niños de *Old Lyme Connecticut* que presentaban síntomas de artritis. Steere y cols. reconocieron que todos los casos correspondían a una sola entidad clínica (2,3). Los síntomas de la enfermedad de Lyme se han confundido con los de muchas enfermedades, como: artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, parálisis de Bell, fiebre reumática, síndrome de Reiter, miocarditis y meningitis

viral (4). Las cepas predominantes en Europa son *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* y *Borrelia burgdorferi*.

Las espiroquetas son transmitidas por garrapatas del género *Ixodes* que se encuentran en reservorios de animales como los ciervos, los ratones, los perros, los caballos y los pájaros. Las garrapatas se suelen encontrar en la vegetación en zonas endémicas, especialmente en zonas de bosques que comparten con el reservorio animal. La incidencia de la infección humana coincide con la estación de las garrapatas, de mayo a septiembre (3, 5).

Aunque los síntomas de la enfermedad de Lyme son diversos y a veces confusos, se reconocen tres fases distintas de la enfermedad. Las primeras manifestaciones consisten en una erupción única o múltiple que se denomina eritema migratorio (EM); es frecuente observar una fase de meningitis en las siguientes semanas a meses. Se sabe que las manifestaciones tardías consisten en artritis o en signos y síntomas neurológicos. En casos asintomáticos o subclínicos, puede que los síntomas de la infección no se pongan de manifiesto hasta fases posteriores de la enfermedad (5).

Los aislados de especies de *Borrelia* en cultivo constituyen una indicación definitiva de infección activa, pero no son prácticos. La detección de anticuerpos específicos es práctica, pero es un marcador de la exposición indirecto. Los pacientes producen anticuerpos IgM en las semanas previas a la aparición del EM. Aunque los anticuerpos de tipo IgM sólo se pueden detectar durante el primer mes, los de tipo IgG aumentan en la mayoría de los pacientes al cabo de un mes aproximadamente. Se pueden detectar concentraciones de IgG e IgM durante años (5,6).

Las cepas de *Borelia* muestran una considerable variación antigénica. A menudo los pacientes crean anticuerpos precoces contra el antígeno flagelar, que pueden dar reacciones cruzadas. Los pacientes que se encuentran en el primer estadio de la enfermedad y una parte de los que presentan las manifestaciones tardías pueden no presentar anticuerpos detectables. El tratamiento antibiótico precoz tras la aparición de la EM puede conducir a la reducción de las concentraciones de anticuerpos. Se ha demostrado que las pruebas serológicas tienen escasa sensibilidad y especificidad, por lo que no sirven para establecer el diagnóstico de enfermedad de Lyme (6, 7 8).

En la Segunda Conferencia Nacional sobre el Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Lyme (1994) se recomendó el uso de un sistema de análisis en dos partes para la serología de Lyme, en el que las muestras positivas y dudosas en un análisis de primer nivel (detección) sensible deben ser analizadas por otro más específico como *Western blot* (segundo nivel, confirmación). Los resultados positivos del análisis del segundo nivel apoyan la demostración de la exposición a *B. burgdorferi*, lo que puede colaborar al diagnóstico clínico de la enfermedad de Lyme pero no sirve como criterio diagnóstico (9).

II. PRINCIPIO

El sistema de EU Lyme Disease IgG de *Trinity Biotech* es una técnica de enzoinmunoanálisis (EIA) indirecto que se sirve de los antígenos nativos purificados de *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína VlsE específica, que se unen a micropocillos de poliestireno. El anticuerpo de la muestra del paciente, que se añade a los micropocillos en el primer paso de este procedimiento, se une al antígeno. Tras un período de lavado que retira el anticuerpo no ligado, se añade una IgG antihumana marcada con peroxidasa a cada micropocillo. En el segundo paso de incubación el conjugado sólo se adherirá si queda anticuerpos IgG humanos ligado procedente de la reacción del primer paso. Tras un segundo período de lavado que elimina el conjugado con peroxidasa no ligado, se añade a los micropocillos una solución indicadora de color, que sólo reaccionará en presencia de peroxidasa ligada. Tras un período de tiempo concreto se añade una solución ácida para detener la conversión enzimática de la solución indicadora para el análisis espectrofotométrico.

III. REACTIVOS QUE SE SUMINISTRAN

Cada *kit* contiene los siguientes componentes en cantidades suficientes para realizar el número de análisis que se indica en el prospecto del envase.

1. Placa de microtitulación recubierta con antígenos nativos purificados de *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *B. burgdorferi* (B 31), incluida la proteína específica VlsE: 96 pocillos configurados en una placa completa, dentro de una bolsa metálica con un desecante. Número de producto 44-8208G
2. Control positivo de *EU Lyme EIA* IgG: suero humano. Proclin (0,1%) añadido como conservante. Número de producto 44-8002, un vial, 100 µl.
3. Control positivo bajo de *EU Lyme EIA* IgG: suero humano. Proclin (0,1%) añadido como conservante. Número de producto 44-8003, un vial, 100 µl.
4. Control negativo de *EU Lyme EIA*: suero humano. Proclin (0,1%) añadido como conservante. Número de producto 44-8001, un vial, 100 µl.
5. Conjugado con peroxidasa, IgG antihumana. IgG antihumana de cabra, con Proclin (0,03%) como conservante. Número de producto 44-8025G, un frasco, 13,5 ml.
6. Cromógeno de *EU Lyme EIA*: Tetrametilbenzidina (TMB). Número de producto 44-1006, un frasco, 13,0 ml.
7. Solución de parada: Contiene una solución de H₃PO₄. Número de producto 40-1004, un frasco, 15 ml.
8. Suero como disolvente: Contiene Proclin (0,1%) añadido como conservante. Número de producto 40-8012, un frasco, 100 ml.
9. Solución de lavado 10x. Contiene PBS, Tween-20. Número de producto 40-1013, un frasco, 100 ml.

IV. PRECAUCIONES

1. Para uso *diagnóstico in vitro*.
2. Los conservantes de los reactivos pueden ser tóxicos si se ingieren. No pipete con la boca.
3. Este *kit* contiene ácido fosfórico 1 M como solución de parada. Siempre que se utilicen soluciones ácidas se utilizarán buenos procedimientos de laboratorio. Evite el contacto con la piel, con los ojos o con la ropa. Utilice agua abundante para lavar las zonas expuestas.

4. Los componentes de suero humano que se emplean en la preparación de los controles de este *kit* han sido analizados con un método de detección de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH 1 y 2), del virus de la hepatitis C (VHC) y del antígeno de superficie de la hepatitis B, y dieron negativo. Como ningún método de análisis puede ofrecer la garantía completa de la ausencia del VIH, el VHC, el VHB u otros agentes infecciosos, las muestras y los reactivos procedentes de seres humanos deben ser manipulados como posible fuente de infección por agentes contagiosos.
5. Los *Centers for Disease Control and Prevention* y los *National Institutes of Health* recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos sean manipulados al nivel de bioseguridad 2 (10).
6. Debe cumplir los requisitos de tiempo y temperatura que se citan en el prospecto, tanto en el paso de incubación como en el de lavado. Si no lo hace así los resultados de la prueba pueden variar significativamente.
7. **Todos los reactivos deben estar a +20° C a +25° C antes de realizar esta prueba. Si la temperatura es superior o inferior los resultados pueden verse sustancialmente modificados.**
8. Si no se va a utilizar toda la placa, utilice las tiras del centro para fijarlas mejor durante los pasos de lavado.
9. No intercambie los componentes de los *kits* de un lote por los de otro.
10. Todos los micropocillos no utilizados deberán conservarse con desecante a +2° C a +8° C entre usos.
11. Evite la contaminación cruzada de los reactivos. Lávese las manos antes y después de manipular los reactivos. La contaminación cruzada de los reactivos y/o de las muestras puede producir resultados falsos.
12. Hay que lavar los pocillos tres veces.
13. Si se utiliza una solución de hipoclorito sódico (lejía) como desinfectante, no exponga la zona de trabajo durante el análisis, para no interferir en la actividad enzimática.
14. Pruebas diseñadas para la detección de anticuerpos contra *Borrelia Afzelii*, *Borrelia Garinii* y *Borrelia burgdorferi* incluida la proteína VlsE:
 - a. No indican cuándo se produjo la exposición.
 - b. No indican si hay replicación activa o no.
 - c. Es frecuente que den resultados falsos negativos y falsos positivos.
 - d. No tienen una función establecida en la detección de dichos anticuerpos en suero obtenido durante las manifestaciones tardías de la enfermedad.
 - e. No suelen detectar anticuerpos durante la presentación clínica de la enfermedad de Lyme precoz, ni siquiera en presencia de eritema migratorio ni aunque se hayan aislado especies de *Borrelia* en los cultivos.
15. Las concentraciones de anticuerpos anti-*Borrelia* en una muestra dada, medidas con pruebas de fabricantes distintos, pueden variar por las diferencias en los métodos de análisis y en la especificidad del reactivo.
16. No mezcle componentes de lotes diferentes y no intercambia los micropocillos o las placas de los *kits* de IgG y de IgM.

V. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

1. Conserve los *kits* a +2° C a +8° C.
2. Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos.
3. Consulte la fecha de caducidad de todos los reactivos.
4. Consulte la fecha de caducidad de las tiras de micropocillos.
5. Devuelva el *kit* al refrigerador inmediatamente después de utilizarlo.
6. Todos los micropocillos abiertos y no utilizados deberán conservarse con desecante a +2° C a +8° C entre usos.

VI. MATERIALES ADICIONALES QUE SE NECESITAN PERO QUE NO SE SUMINISTRAN

1. Microtubos.
2. Bandeja para microtubos.
3. Envase de conservación, 1,0 l, de plástico o de cristal.
4. Pipetores de 10 µl, 100 µl y 1,0 ml de capacidad.
5. Pipetor de 100 µl de capacidad, 8 canales (opcional).
6. Envase para desechos.
7. Temporizados, 30 minutos.
8. Bolsa de plástico para estrujar, 500 ml.
9. Papel absorbente (toallas).
10. Agua destilada.
11. Lector de placas de EIA con filtro de 450 nm.
12. Conservación con desecante para las tiras de micropocillos abiertas.

VII. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Para cada determinación, prepare una solución de lavado utilizando la solución 10X suministrada. Al retirar del frigorífico la solución 10X, ésta puede presentar sales sin disolver. Espere a que el reactivo alcance la temperatura ambiente y agite el frasco para disolver estas sales. No dispense el reactivo hasta que las sales no estén totalmente disueltas.
2. Para preparar la solución para lavado 1X, diluya 1X parte de concentrado y 9 partes de agua destilada o desionizada en un frasco cuentagotas de plástico limpio. Para cada tira de 8 pocillos que se desee utilizar, prepare como mínimo 50 ml de solución de lavado diluida.
3. El cromógeno está listo para su uso.
4. El conjugado está listo para su uso.
5. El diluyente de suero está listo para su uso.

VIII. COLECTA DE MUESTRAS

Las muestras serológicas deben colectarse en condiciones asépticas. Para evitar la hemólisis deberá separarse rápidamente el suero del coágulo. El suero debe conservarse a una temperatura de 2°C a 8°C si va a ser analizado en el plazo de 4 a 7 días. El suero puede conservarse durante 3 a 6 meses a una temperatura de -20°C o inferior. Debe evitarse el uso de suero lipídico o muy hemolítico. Si las muestras deben ser transportadas a temperatura ambiente, se recomienda añadir un conservante como, p. ej., timerosal (mertiolato) al 0,01% o azida sódica al 0,1%. El NCCLS ha dictado recomendaciones para la conservación de muestras de sangre (Procedimiento Estándar Aprobado para el Manejo y el Procesamiento de Muestras de Sangre, H18-A2 1999) (11).

IX. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

En cada placa de microtitulación que se vaya a analizar deberán incluirse un control positivo, tres calibradores, un control negativo y un blanco de reactivo. **En cada ciclo, diluya los controles del kit al mismo tiempo que las muestras problema.** El blanco de reactivo se prepara con diluyente de suero pero sin añadir suero humano. Preparar los controles y las muestras problema en tubos para predilución adecuadamente marcados, como se indica a continuación:

1. Añada a cada tubo de ensayo 1,0 ml de diluyente de suero.
2. Añada 10 µl de cada suero a su correspondiente tubo y mezcle bien.
3. Coloque cada tubo en su gradilla.
4. A continuación diluya las muestras, los controles y los controles positivo bajo 1:100; así quedan listas para ser aplicadas en las placas de pocillos sensibilizadas con *Borrelia*.

X. PROCEDIMIENTO DE TRABAJO

1. Extraiga la placa completa de su bolsa metálica. Si no se utiliza una placa completa, deberá centrarse las tiras en la placa para asegurarlas durante los lavados. Devuelva a la bolsa metálica las tiras que no vaya a utilizar, y ciérrela herméticamente. Las tiras sin utilizar deben colocarse en una estufa de desecación a temperaturas de +2°C a +8°C.
2. Añada 100 µl de cada dilución de control, de positivo bajo, de muestra y de blanco de reactivo a los pocillos, y anótelos en la hoja de trabajo EIA.
3. Incube a (20°C a 25°C) durante 30 minutos.
4. Agite bien los pocillos para desechar el contenido. Rellene los pocillos con solución de lavado.
5. Repita el paso 4 dos veces. Seque las tiras en papel absorbente.
6. Añada 100 µl de conjugado a cada pocillo.
7. Incube a (20°C a 25°C) durante 30 minutos.
8. Repita los pasos 4 y 5.
9. Añada 100 µl de cromógeno a cada pocillo.
10. Incube a (20°C a 25°C) durante 15 minutos. Los pocillos positivos presentarán un color azul.
11. Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Mezcle golpeando suavemente con los dedos el lateral de la placa para distribuir de forma homogénea la solución de parada. Evite que se formen burbujas. Los pocillos positivos presentarán un color amarillo.
12. Incube durante 2 minutos.
13. Lea las tiras en un lector de placas EIA a 450 nm en los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

XI. CONTROL DE CALIDAD

Para analizar la intensidad del color es necesario utilizar un espectrofotómetro o un lector de placas EIA con un filtro a 450 nm.

1. Lea la placa a 450 nm. Imprima los valores de la densidad óptica (DO_{450}).
2. Redondee el valor de la DO del pocillo de blanco de reactivo a 2 decimales y reste su valor de todos los valores de DO del ensayo. ($0,795 = 0,80$, $2,333 = 2,33$).
3. Redondee todas las DO del ensayo como se ha indicado anteriormente.
4. Calcule la DO media de los tres pocillos de calibrador. Si uno de los tres pocillos presenta un valor de DO superior en un 10% a la media, descártelo y vuelva a calcular la media con los otros dos pocillos. Si las DO de estos dos pocillos no se encuentran dentro del 10% de la media, los resultados se considerarán no válidos y deberá repetir la prueba.
5. Para calcular el valor del índice de Lyme (LIV), divida el valor de la DO por la DO media del control positivo bajo.
6. La prueba se considera válida a todos los efectos si:
 - a. El control positivo presenta un $LIV \geq 1,50$.
 - b. El control negativo presenta un $LIV < 0,50$.
 - c. El control positivo bajo presenta una DO de 0,45 a 0,95.
 - d. El blanco presenta una $DO < 0,175$.

XII. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si el LIV es $\geq 1,0$ se considerará que existe una presunta exposición a *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y/o *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica VlsE.

XIII. NOTIFICACIÓN

Positivo – Índice de Lyme $\geq 1,0$

Se considera que un resultado positivo indica que existe una presunta exposición a *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y/o *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica VlsE. El resultado debe acompañarse de una prueba de segundo nivel que sea más específica para anticuerpos contra *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica, y no debe ser comunicado hasta que finalice la prueba de segundo nivel. Un resultado positivo no indica el momento en que se ha producido la exposición.

Negativo – Índice de Lyme $< 0,5$

No existen anticuerpos detectables anti-*B. burgdorferi*. Un resultado negativo indica que, desde el punto de vista serológico, nada indica que haya habido exposición a *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y/o *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica VlsE en el momento en el que se obtuvo la muestra. Un resultado negativo no debe tomarse como base para excluir a *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica VlsE como causa de enfermedad, especialmente si la sangre fue obtenida en las 2 semanas anteriores al momento de aparición de los síntomas. Si existe una fuerte sospecha de enfermedad de Lyme, se obtendrá una segunda muestra 2 a 4 semanas después de la primera para repetir el análisis.

Dudoso – Índice de Lyme $\geq 0,5$ y $\leq 0,99$

Un resultado dudoso indica que puede haber habido exposición a *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y/o *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica VlsE. El resultado debe acompañarse de una prueba de segundo nivel que sea más específica para anticuerpos contra *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y *B. burgdorferi* (B 31) incluida la proteína específica, y no debe ser comunicado hasta que finalice la prueba de segundo nivel.

XIV. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los sueros de pacientes con otras enfermedades por espiroquetas tales como sífilis, frambesia, pinta, leptospirosis o fiebre recurrente pueden dar resultados falsos positivos. Los sueros de pacientes con mononucleosis o lupus eritematoso también pueden dar resultados falsos positivos. Cuando se obtengan resultados falsos positivos, deberán realizarse asimismo estudios clínicos, epidemiológicos y de laboratorio. Aunque el cuadro clínico de la sífilis activa y el de la enfermedad de Lyme son bastante diferentes, las pruebas VDRL o RRP permiten distinguirlos con facilidad. En la sífilis activa el VDRL o el RRP son positivos. En la enfermedad de Lyme, el VDRL y el RRP son negativos.
- Los pacientes en la fase temprana de la enfermedad de Lyme pueden no dar resultados positivos con esta prueba. Los anticuerpos IgG pueden no haber alcanzado niveles detectables en la fase temprana de la enfermedad de Lyme durante la fase clínica de EM. Los resultados negativos en las primeras fases de la enfermedad tienen un valor predictivo bajo.
- Para detectar una infección en la fase temprana, deberá utilizarse un sistema de reactivo diseñado para detectar anticuerpos IgM sin que existan interferencias por parte del factor reumatoide o de los anticuerpos IgG.
- La administración de tratamiento antibiótico al comienzo de la enfermedad puede evitar el desarrollo de una respuesta a los anticuerpos.
- En la evaluación de todos los resultados de las pruebas deberán tenerse en cuenta la historia clínica del paciente, su exposición del paciente en regiones en las que la enfermedad de Lyme es endémica, los datos epidemiológicos, los resultados de otras pruebas y cualquier otra enfermedad por

espiroquetas padecida. Los resultados positivos en caso de pacientes que no tienen una historia de exposición a la enfermedad de Lyme ni síntomas ni hallazgos clínicos coherentes con la enfermedad de Lyme, pueden tener un valor predictivo bajo.

- Los resultados positivos o dudosos de la prueba de primer nivel no deben ser registrados hasta haber realizado la prueba de segundo nivel de la muestra con un método más específico como el Western blot.
- El uso de esta prueba no ha sido evaluado en personas que hayan sido vacunadas contra la enfermedad de Lyme.

XV. VALORES PREVISTOS

En pacientes sin infección presente o pasada por *Borrelia afzelii* (PKO), *Borrelia garinii* (G2) y/o *B. burgdorferi* (B 31), los resultados deben ser negativos salvo en pacientes con anticuerpos que presenten una reacción cruzada (véanse las Limitaciones).

En pacientes con la enfermedad de Lyme, los resultados dependerán de la fase de la enfermedad. Los títulos de anticuerpos IgG pueden ser detectados en las 2 a 3 semanas siguientes al comienzo de la enfermedad. La proteína VisE es un marcador muy precoz de la respuesta inmunitaria de las IgG, y los anticuerpos contra ella pueden persistir. A medida que avanza la enfermedad, aumentan las posibilidades de obtener un resultado positivo en las pruebas. Si no han pasado 3 semanas desde el inicio del EM, la prueba da positivo para IgG en el 25% de los casos. Las personas con síntomas de la segunda fase dan casi siempre positivo, al igual que las personas con síntomas de la tercera fase.

La determinación IgG es la más útil para detectar los casos presentes o pasados de enfermedad de Lyme. Para la detección precoz se recomienda utilizar una prueba que detecta la respuesta de IgG contra la proteína VisE o anticuerpos de la clase IgM. Los anticuerpos IgM aumentan rápidamente tras la infección, alcanzan su máximo a las 3 semanas y a continuación disminuyen rápidamente. Los anticuerpos IgG comienzan a aumentar a las 2 a 3 semanas de la infección, persisten mientras los síntomas están presentes y disminuyen lentamente durante la recuperación (5,6).

XVI. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RENDIMIENTO

Especificidad

La especificidad de *Trinity Biotech IgG* fue evaluada en un laboratorio de diagnóstico independiente en Inglaterra. El estudio fue llevado a cabo con un grupo de 100 muestras de suero tomadas de donantes presuntamente sanos que vivían en una zona en la que la borreliosis de Lyme es endémica.

La especificidad relativa es del 98% (98/100).

Sensibilidad

El estudio fue llevado a cabo con tres grupos de muestras de suero de pacientes que presentaban alguna de las manifestaciones clínicas más habituales de la infección por borrelias: 55 muestras de suero de pacientes con eritema migratorio, 30 muestras de suero de pacientes con artritis y 40 muestras de suero de pacientes con neuroborreliosis.

	Sensibilidad diagnóstica para IgG	Sensibilidad diagnóstica a de IgG, IgM
Eritema migratorio	9 de 55 84%	8 de 55 85.5%
Artritis	3 de 30 90%	2 de 30 93%
Neuroborreliosis	1 de 40 97.5%	0 de 40 100%

XVI. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL RENDIMIENTO (cont.)

Reactividad cruzada

Se utilizó la prueba *Trinity Biotech IgG* para evaluar sueros de pacientes con sífilis, enfermedades inflamatorias con factor reumatoide (FR) positivo, enfermedades autoinmunitarias e infección por *Toxoplasma gondii*, con los siguientes resultados:

Sueros de los pacientes	Número de muestras de suero	Número de positivos
Sífilis	20	2
FR	20	1
Enfermedades autoinmunitarias	20	0
<i>Toxoplasma gondii</i>	20	0

XVII. REPRODUCIBILIDAD

En diferentes ensayos

Muestra	Media	DE	% CV
1	0.070	0.008	11.7
2	3.893	0.172	4.4
3	2.400	0.164	6.8
4	3.537	0.167	4.7
5	0.423	0.053	12.5
6	3.063	0.144	4.7


















En un mismo ensayo

Muestra	Media	DE	CV
1	0.084	0.010	12.0
2	3.671	0.245	6.7
3	2.304	0.069	3.0
4	3.166	0.274	8.7
5	0.413	0.036	8.7
6	2.924	0.098	3.4

XVIII. BIBLIOGRAFÍA

24. Steere et.al. 1986. J. Infect. Dis. 154(2): 295-300.
25. Steere et.al. 1977. Arthritis Rheumatism. 20(1): 7-17.
26. Steere et.al. 1983. N.E.J.M. 308(13): 733-740.
27. Burgdorfer et.al. 1982. Science. 216: 317-1319.
28. Barbour et.al. 1988. Clin. Microbiol. Rev. 1(4): 399-411.
29. Agüero-Rosenfeld et.al. 1993. J. Clin. Microbiol. 31(12): 3090-3095.
30. Magnarelli et.al. 1987. J. Infect. Dis. 156(1): 183-188.
31. Bakken et.al. 1997. J. Clin Microbiol. 35(3):537-543.
32. Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 44:590-591.
33. CDC/NIH Guidelines. 1993. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd Ed. pp 9-12. USHHS, PHS.
34. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1999. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Publication H18-A2.

Key Guide to Symbols

Symbol	
	Product Number, Référence, Produktnummer, Codice prodotto, Número de producto
	Lot Number, Numéro de lot, Chargennummer, Numero di lotto, Número de lote
	In Vitro Diagnostic Medical Device, Dispositif médical de <i>diagnostic in vitro</i> , Medizinisches Instrument zur In-vitro-Diagnose, Dispositivo medico per test diagnostici <i>in vitro</i> , Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Authorized Representative in the European Community, Mandataire dans la communauté européenne, Autorisierter Vertreter für die Europäische Gemeinschaft, Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea, Representante autorizado en la CE
	Use By, Utiliser avant le, Verwendbar bis, Utilizzare entro, Fecha de caducidad
	Caution, consult accompanying documents, Attention voir notice d'instruction, Vorsicht, Begleitdokumente lesen, Attenzione: consultare la documentazione allegata, Precaución, consulte los documentos adjuntos
	Temperature limitation, Limite de temperature, Temperaturbeschränkung, Limiti di temperatura, Temperatura limitada
	Manufacturer, Fabrikant, Hersteller, Produttore, Fabricante
	Negative Control, Contrôle négatif, Negative Kontrolle, Controllo negativo, Control negativo
	Positive Control, Contrôle positif, Positive Kontrolle, Controllo positivo, Control positivo
	Conjugate, Conjugué, Konjugat, Coniugato, Conjugado
	EIA Microwell Full Plate, EIA Microplaque complète, Volle EIA-Mikrotiter-Platte, Piastra completa di micropozzetti EIA, Placa completa de pocilos para microtitulación con EIA
	Low Positive Control, Contrôle faiblement positif, Schwach-Positiv-Kontrolle, Controllo positivo valori bassi, Control positivo bajo
	EIA Color Developer, Révélateur chromogène immunoenzymatique, EIA-Farbenentwickler, Sviluppo di colore per test immunoenzimatico, Cromógeno del EIA
	Stop Solution, Solution d'arrêt, Stopplösung, Soluzione di bloccaggio, Solución de parada
	EIA Serum Diluent, EIA Diluant sérum, EIA-Serumverdünnungsmittel, Diluente del siero EIA, Suero disolvente para EIA
	EIA 10X Wash Solution, EIA Solution de lavage 10X, EIA-10X-Waschlösung, Soluzione di lavaggio 10X EIA, Solución EIA para 10 lavados



MarDx Diagnostics, Inc.
A Trinity Biotech Company
5919 Farnsworth Court
Carlsbad, CA 92008
Phone: 760-929-0500
Fax: 760-929-0124

Trinity Biotech plc.
IDA Business Park
Bray, County Wicklow, Ireland
Phone: +353-1-276-9800
Fax: +353-1-276-9888
Web: www.trinitybiotech.com