

# NADAL<sup>®</sup> Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (test cassette)

REF 870001



<b>DE</b>	Gebrauchsanweisung	2	<b>CZ</b>	Návod k použití	36
<b>EN</b>	Instructions for use	7	<b>NO</b>	Bruksanvisning	40
<b>FR</b>	Instructions d'utilisation	11		Symbols	47
<b>ES</b>	Instrucciones de uso	16		Our Teams	48
<b>IT</b>	Istruzioni per l'uso	21			
<b>PL</b>	Sposób użycia	26			
<b>PT</b>	Instruções de Utilização	31			



### 1. Verwendungszweck und Anwendungsbereich

Der NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test ist ein schneller, qualitativer Screening-Test zum Nachweis von humanem IgG und IgM gegen europäische Borreliensämme in humanem Serum und Plasma. Der Test ist als Hilfsmittel bei der Diagnose einer Lyme-Borreliose (auch als Lyme-Krankheit bekannt) bestimmt und nur für den professionellen Gebrauch ausgelegt. Der NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test ermöglicht jedoch nicht, bei einem positiven Ergebnis das Stadium der Erkrankung zu bestimmen.

### 2. Einleitung und Diagnostische Bedeutung

Die Lyme-Borreliose (1) oder Lyme-Krankheit wird durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi sensu lato* hervorgerufen, die durch Zecken übertragen wird. Ansteckende Zecken, die mit *Borrelia burgdorferi sensu lato* infiziert sind, sind hauptsächlich in Nordamerika (*Ixodes scapularis* oder *Ixodes pacificus*) und in den gemäßigten westeuropäischen Gebieten (*Ixodes ricinus*) verbreitet. Europäische Zeckenarten sind Überträger von europäischen Borreliensämmen, wie z. B. *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* und *B. garinii* (2), sowie *B. spielmanii* und *B. bavariensis*, die ebenfalls als pathogen bekannt sind. *B. valaisiana* und *B. lusitanae* werden ebenfalls als potentiell pathogene Stämme betrachtet. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Borreliensämme kreuzreagieren IgG und IgM, welche gegen verschiedene Borrelien-Spezies gerichtet sind, mit dem Antigen-Cocktail des NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Tests, zumindest bei europäischen Stämmen.

In 30% bis 80% der Fälle ist ein Hautausschlag (*Erythema chronicum migrans*) das erste klinische Anzeichen der Infektion, der nach 3 bis 10 Tagen an der Stelle des Zeckenbisses erscheint. 1 bis 3 Monate später erscheinen die ersten neurologischen Anzeichen, wie z. B. Kopfschmerzen oder schwere Störungen wie Myelitis (3), sogar in Abwesenheit des *Erythema chronicum migrans*. Die Patienten können auch schwere Komplikationen entwickeln, wie z. B. intermittierende Anfälle von Gelenkarthritis sowie viel später, auch mehrere Jahre nach der Primärinfektion, Myokarditis oder Acrodermatitis.

### 3. Testprinzip

Die einzigartige Kombination von anti-human Immunglobulinen-Farbstoff-Konjugaten und hochgereinigten nativen *B. burgdorferi*- und *B. garinii*- sowie rekombinanten *B. burgdorferi*-Antigenen auf der Festphase wird im NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test verwendet, um anti-Borrelien-Antikörper spezifisch nachzuweisen.

Der NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test besteht aus einem Kunststoffgehäuse, das zwei interne Teststreifen zum Nachweis von IgG oder IgM enthält. Nach der Entnahme der Plasma- oder Serumprobe werden einige Tropfen der Probe in jede Vertiefung (⇒) der Testkassette gegeben. Wenn die Probe für den IgM-Nachweis die Membran des Streifens entlang wandert, binden anti-human Immunglobuline-Farbstoff-Konjugate an humane IgM, dabei werden Antikörper-Antigen-Komplexe gebildet. Auf gleiche Weise wandert die Probe für den IgG-Nachweis die Membran des Streifens entlang, wo anti-human Immunglobuline-Farbstoff-Konjugate an humane IgG binden, dabei werden Antikörper-

Antigen-Komplexe gebildet. Im Falle von positiven Ergebnissen, binden diese Komplexe an spezifische Antigene in Testlinienbereich(en) der Testkassette und rufen (eine) rosa Linie(n) hervor. In Abwesenheit von anti-Borrelien-Antikörpern, erscheinen keine Linien in den Testlinienbereichen der Testkassette. Das Reaktionsgemisch wandert nun weiter die Membranen entlang. Ungebundene Konjugate binden an die Reagenzien in jedem Kontrolllinienbereich, dabei entsteht jeweils eine rosa Linie, die darauf hinweist, dass genügend Probenvolumen hinzugegeben wurde und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

### 4. Bestandteile der Testpackung

- 10 NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Testkassetten (inkl. Einwegpipetten aus Kunststoff)
- 1 Puffer "Buffer" (6 ml), der ein Detergens und <0,1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> enthält
- 1 Gebrauchsanweisung

### 5. Zusätzlich benötigte Materialien

- Timer

### 6. Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Alle Bestandteile des NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test-Kits sollten zwischen +4°C und +30°C gelagert werden. Die Testkassette muss bis zum Gebrauch im verschlossenen Folienbeutel verbleiben. Frieren Sie das Test-Kit nicht ein. Der NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test ist bis zum auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

### 7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Nur für den professionellen *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch.
- Lesen Sie die komplette Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung sorgfältig durch.
- Den Test nicht nach dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Test nicht verwenden, wenn der Folienbeutel beschädigt ist.
- Tests nicht wiederverwenden.
- Proben nicht in das Reaktionsfeld (Ergebnisfeld) geben.
- Das Reaktionsfeld (Ergebnisfeld) nicht berühren, um Kontaminierung zu vermeiden.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen sollte für jede Probe ein eigenes Probennahmeröhrchen verwendet werden.
- Keine Bestandteile aus unterschiedlichen Test-Kits austauschen oder mischen.
- Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in dem Bereich, in dem mit Proben und Test-Kits umgegangen wird.
- Tragen Sie beim Umgang mit Proben Schutzkleidung wie Laborkittel, Einmalhandschuhe und Schutzbrille.
- Behandeln Sie alle Proben so, als ob sie infektiöse Reagenzien enthielten. Beachten Sie bestehende Vorsichtsmaßnahmen für mikrobiologische Risiken während aller Verfahren sowie Standardrichtlinien für die korrekte Probenentsorgung.
- Dieser Test enthält Erzeugnisse tierischen Ursprungs. Zertifizierte Kenntnisse der Herkunft und/oder des Sanitätszustands der Tiere gewährleisten nicht völlig die Abwesenheit übertragbarer Pathogene. Es wird daher empfohlen, diese Produkte als potentiell infektiös zu betrachten und sie

gemäß den üblichen Sicherheitsvorkehrungen zu behandeln (z.B. Verschlucken oder Einatmen vermeiden).

- Die Pufferlösung enthält Natriumazid, das mit Blei- oder Kupferwasserleitungen zu potentiell explosiven Metallaziden reagiert. Wenn Sie die Pufferlösung entsorgen, spülen Sie mit reichlich Wasser nach, um eine übermäßige Azid-Ansammlung zu verhindern. Vermeiden Sie jeden Kontakt mit den Augen und den Schleimhäuten. Bei versehentlichem Kontakt mit viel Wasser sorgfältig waschen.
- Feuchtigkeit und Temperaturen können Testergebnisse beeinträchtigen.
- Benutzte Testmaterialien sollten gemäß lokalen Vorgaben entsorgt werden.

### 8. Probennahme, -vorbereitung und -lagerung

#### Serum oder Plasma (Lithium- oder Ammoniumheparin, EDTA)

Proben sollten unter Standardlaborbedingungen (aseptisch und unter Vermeidung von Hämolyse) entnommen werden.

Proben sollten im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert werden, wenn der Test innerhalb von 48 Stunden nach der Probenentnahme durchgeführt werden soll.

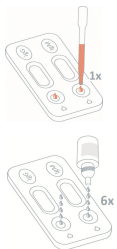
Wenn der Test nach mehr als 48 Stunden nach der Probenentnahme durchgeführt werden soll, sollten Proben eingefroren gelagert werden. Eingefrorene Proben müssen vor der Testdurchführung vollständig aufgetaut, gründlich gemischt und auf Raumtemperatur gebracht werden. Vermeiden Sie wiederholte Einfrieren- und Auftauen-Zyklen.

Im Falle von Trübung, eine hohe Viskosität oder das Vorhandensein von Partikeln in Serumproben, sollten sie vor der Testung mit dem gleichen Volumen (V/V) Verdünnungspuffer verdünnt werden (nicht mitgeliefert, aber auf Anfrage erhältlich).

### 9. Testdurchführung

#### Bringen Sie die Testkassette, den Puffer, die Probe und/oder die Kontrollen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (15-30°C).

1. Entnehmen Sie die Testkassette dem verschlossenen Folienbeutel und verwenden Sie sie baldmöglichst. Kennzeichnen Sie die Testkassette mit dem Patienten-namen oder einer Kontrollnummer.
2. Füllen Sie eine Einwegpipette mit der Serum- oder Plasmaprobe. Halten Sie die Pipette senkrecht und geben Sie 1 Tropfen (25 µL) der Probe in jede Probenvertiefung (⇒).
3. Geben Sie genau 6 Tropfen (200 µL) Puffer in jede Probenvertiefung (⇒).



4. Werten Sie das Testergebnis nach 10 bis 15 Minuten aus. Nach mehr als 15 Minuten keine Testergebnisse mehr auswerten.

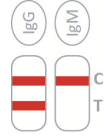


10-15 min

### 10. Testauswertung

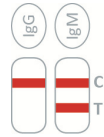
#### Positiv für IgG:

Eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „T“ für IgG.



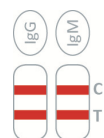
#### Positiv für IgM:

Eine farbige Linie erscheint in jedem Kontrolllinienbereich „C“ und eine farbige Linie erscheint im Testlinienbereich „T“ für IgM.



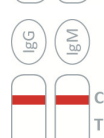
#### Positiv für IgG und IgM:

Zusätzlich zu den Kontrolllinien „C“, erscheint jeweils eine farbige Linie in den Testlinienbereichen „T“ für IgG und IgM.



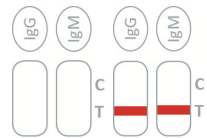
#### Negativ:

Es erscheint jeweils nur eine farbige Linie in jedem Kontrolllinienbereich „C“. Es erscheinen keine farbigen Linien in den Testlinienbereichen „T“ für IgG und IgM.



#### Ungültig:

Die Kontrolllinien „C“ erscheinen nicht. Ergebnisse von den Tests, die nach der festgelegten Auswertzeit keine Kontrolllinien gebildet haben, müssen verworfen werden.



Ungenügendes Probenvolumen, abgelaufene Tests oder fehlerhafte Vorgehensweise sind die wahrscheinlichsten Ursachen dafür, dass die Kontrolllinie nicht erscheint. Überprüfen Sie den Verfahrensablauf und wiederholen Sie die Testung mit einer neuen Testkassette. Falls das Problem weiterbesteht, verwenden Sie das Test-Kit bitte nicht weiter und setzen Sie sich mit ihrem Distributor in Verbindung.

### 11. Qualitätskontrolle

#### Interne Kontrolle:

Eine im Kontrolllinienbereich „C“ erscheinende farbige Linie wird als interne Verfahrenskontrolle betrachtet. Sie bestätigt ausreichendes Probenvolumen, eine korrekte Verfahrenstechnik und dass die Membran ausreichend durchnässt ist.

#### Externe Kontrolle:

Es empfiehlt sich der Einsatz von externen Positiv- und Negativkontrollen zum Nachweis der einwandfreien Leistung des Tests.

### 12. Grenzen des Tests

- Das mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test erhaltene Ergebnis sollte nicht als einziges Kriterium für die Diagnose einer Lyme-Borreliose verwendet werden.
- Eine Immunreaktion kann bei infizierten Patienten verspätet einsetzen. Während des Primärstadiums (I) der Erkrankung (6), die durch die Entwicklung eines *Erythema migrans* gekennzeichnet ist, können IgM erst 2 bis 6 Wochen nach dem Zeckenbiss und nur in 40 bis 60% der

Fälle nachgewiesen werden. Während des zweiten Stadiums (II), das der Entwicklung einer akuten Neuroborreliose entspricht, werden IgM und IgG in 70 bis 90% der Fälle nachgewiesen. Daher ist es empfehlenswert, wenn erstmals ein negatives Ergebnis erhalten wurde, einen weiteren Test 4 bis 6 Wochen später durchzuführen, um den Antikörperspiegel zu überprüfen. Während des dritten Stadiums der Erkrankung (III), das durch eine chronische atrophische Acrodermatitis und Lyme-Arthritis gekennzeichnet ist, sind in der Regel IgM und IgG nachweisbar.

- Einige Faktoren, wie z. B. sehr frühe Infektionsstadien oder eine vorherige Behandlung des Patienten mit Antibiotika, können zu falsch negativen Ergebnissen aufgrund der niedrigen Konzentrationen von anti-Borrelien-IgM führen, welche mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test nicht nachgewiesen werden können.
- In einigen Fällen könnte ein positives Ergebnis aufgrund der IgG- oder IgM-Persistenz für mehr als 10 Jahre nach der Behandlung erhalten werden (7). Aufgrund von beobachteten Kreuzreaktionen (siehe Tabelle 2 für IgG und Tabelle 8 für IgM im Abschnitt "Kreuzreaktionen und analytische Spezifität"), wie z. B. mit anti-CMV-Antikörpern für IgM, ist es wichtig, die endgültige Auswertung des mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test erhaltenen Testergebnisses vorsichtig zu interpretieren.
- Antikörperkonzentrationen können variabel und von getesteten Patienten abhängig sein. Die Antikörperprävalenz in der Gesamtbevölkerung liegt in der Nähe von 3% bis 5%, während Antikörper in Personen, die Borrelien vermehrt ausgesetzt sind (Förstern, Wanderern), in 25% bis 30% der Fälle nachgewiesen werden können (5).
- Wie bei allen diagnostischen Verfahren, sollte der Arzt die mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test erhaltenen Daten im Zusammenhang mit anderer, klinischer Information evaluieren, weil Patienten, die an Borreliose leiden, ähnliche Symptome wie die von Syphilis aufweisen können (4).
- Der NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test sollte unter Berücksichtigung aller Kriterien, wie der historischen epidemiologischen Situation in der Region, der Symptome des Patienten sowie der Testeinschränkungen verwendet werden.

### 13. Leistungsmerkmale des Tests

#### Lyme-IgG

#### Diagnostische Sensitivität und Spezifität

141 Serumproben aus verschiedenen Panels europäischen Ursprungs, die mittels der EIA-Methode (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin und Enzygnost Dade-Behring) vorgetestet wurden, wurden mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 1**

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	Referenzmethode (EIA)		
	+	-	Total
+	61	11	72
-	14	55	69
Total	75	66	141

Die Leistungsfähigkeit wird aus den Daten, die in der obigen Tabelle dargestellt sind, wie folgt berechnet:

Sensitivität:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Spezifität:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Gesamtübereinstimmung:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

#### Kreuzreaktionen und analytische Spezifität

Serumproben, welche hohe Konzentrationen von anti-*Treponema pallidum*-Antikörpern, Rheumafaktoren, anti-EBV-, anti-CMV- oder antinukleären Antikörpern enthielten, wurden mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet, um mögliche Interferenzen zu bewerten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

**Tabelle 2**

Positive Proben	mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test erhaltene positive Ergebnisse (IgG)	Gesamtanzahl der Proben
Syphilis	0	44
Rheumafaktoren	2	30
anti-EBV-Antikörper	0	30
anti-CMV-Antikörper	0	30
antinukleäre Antikörper	1	30
Gesamtanzahl der Proben	3	164

Die Ergebnisse zeigen, dass Kreuzreaktionen mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test auftreten können, wenn die Proben hohe Konzentrationen von Rheumafaktoren oder antinukleären Antikörpern enthalten. Die analytische Gesamtspezifität, die beim Testen dieser potentiell interferierenden Proben erhalten wurde, beträgt jedoch immer noch 98,2% (161/164).

#### Interferenzen

Serumproben, die mittels der ELISA-Methode (Virotech) getestet wurden, wurden mit humanem Hämoglobin (2,5 g/L), Bilirubin (0,3 g/L) oder Triglyceriden (10 g/L) versetzt. Diese Proben wurden parallel auch ohne Zugabe von den Substanzen mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet.

Die Ergebnisse sind entsprechend in den folgenden Tabellen dargestellt:

**Tabelle 3**

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)	Referenz ohne Hämoglobin	mit 2,5 g/L Hämoglobin versetzt
98 (negativ)	5,8 (> 9)	-	-
62 (schwach positiv)	20,4 (> 9)	+	+
91 (stark positiv)	47,5 (> 9)	+	+

Tabelle 4

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Referenz ohne Bilirubin	mit 0,3 g/L Bilirubin versetzt
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)		
98 (negativ)	5,8 (> 9)	–	–
62 (schwach positiv)	20,4 (> 9)	+	+
91 (stark positiv)	47,5 (> 9)	+	+

Tabelle 5

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Referenz ohne Triglyceride	mit 10 g/L Triglyceriden versetzt
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)		
98 (negativ)	5,8 (> 9)	–	–
62 (schwach positiv)	20,4 (> 9)	+	+
91 (stark positiv)	47,5 (> 9)	+	+

Die Ergebnisse zeigen, dass Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceride bis zu Konzentrationen von 2,5 g/L, 0,3 g/L und 10 g/L mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test nicht interferieren.

### Lyme-IgM

#### Diagnostische Sensitivität und Spezifität

251 Serumproben aus verschiedenen Panels europäischen Ursprungs, die mittels der EIA-Methode (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin und Enzygnost Dade-Behring) vorgetestet wurden, wurden mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 6

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	Referenzmethode (EIA)		
	+	–	Total
	+	139	16
–	14	82	96
Total	153	98	251

Die Leistungsfähigkeit wird aus den Daten, die in der obigen Tabelle dargestellt sind, wie folgt berechnet:

Sensitivität:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Spezifität:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Gesamtübereinstimmung:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

#### Diagnostische Sensitivität in den 3 klinischen Stadien der Lyme-Borreliose

Eine Studie wurde in einem europäischen Referenzlabor für Borreliose unter Verwendung von Serumproben durchgeführt, welche verschiedenen klinischen Stadien der Lyme-Krankheit entsprechen: Stadium I, das durch *Erythema chronicum migrans* (EM) gekennzeichnet ist; Stadium II, das der Entwicklung einer akuten Neuroborreliose (NB) entspricht und Stadium III, das durch chronische atrophische Acrodermatitis (ACA) und Lyme-Arthritis (LA) gekennzeichnet ist.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 7

Stadium	Probenanzahl	Anzahl positiver Proben		Sensitivität in %
		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	DIASORIN ELISA (Cut-Off: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Unter den getesteten Proben waren 4 Proben des Stadiums I, 5 Proben des Stadiums II und 7 Proben des Stadiums III sehr IgM schwach positiv (Titer unter 1,5 x Cut-Off-Wert).

#### Kreuzreaktionen und analytische Spezifität

Serumproben, welche hohe Konzentrationen von anti-*Treponema pallidum*-Antikörpern, Rheumafaktoren, anti-EBV-, anti-CMV- oder antinukleären Antikörpern enthielten, wurden mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet, um mögliche Interferenzen zu bewerten. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 8

Positive Proben	mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test erhaltene positive Ergebnisse (IgM)	Gesamtanzahl der Proben
Syphilis	6	53
Rheumafaktoren	1	30
anti-EBV-Antikörper	3	30
anti-CMV-Antikörper	9	30
antinukleäre Antikörper	4	30
Gesamtanzahl der Proben	23	173

Die Ergebnisse zeigen, dass Kreuzreaktionen mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test auftreten können, wenn die Proben hohe Konzentrationen von Rheumafaktoren, anti-*Treponema pallidum*-Antikörpern oder antinukleären Antikörpern enthalten. Die analytische Gesamtspezifität, die beim Testen dieser potentiell interferierenden Proben erhalten wurde, beträgt jedoch immer noch 86,7% (150/173).

#### Interferenzen

Serumproben, die mittels ELISA-Methoden (Diasorin, Euroimmun) getestet wurden, wurden mit humanem Hämoglobin (5 g/L), Bilirubin (0,3 g/L) oder Triglyceriden (30 g/L) versetzt. Diese Proben wurden parallel auch ohne Zugabe von den Substanzen mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test getestet.

Die Ergebnisse sind entsprechend in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tabelle 9

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
		Referenz ohne Hämoglobin	mit 5 g/L Hämoglobin versetzt
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)		
19 (negativ)	6,9 (> 22)	–	–
43 (schwach positiv)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (stark positiv)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabelle 10

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)	Referenz ohne Bilirubin	mit 0,3 g/L Bilirubin versetzt
19 (negativ)	6,9 (> 22)	–	–
43 (schwach positiv)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (stark positiv)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabelle 11

mittels ELISA-Methode titrierte Proben		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Probenanzahl	Titer in UA/mL (Cut-Off)	Referenz ohne Triglyceride	mit 30 g/L Triglyceriden versetzt
19 (negativ)	6,9 (> 22)	–	–
43 (schwach positiv)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (stark positiv)	5,6 (> 0,8)	+	+

Die Ergebnisse zeigen, dass Hämoglobin, Bilirubin und Triglyceride bis zu Konzentrationen von 5 g/L, 0,3 g/L und 30 g/L mit dem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test nicht interferieren.

#### Wirkung von Gefrier-Auftau-Zyklen

Negative, schwach positive und stark positive anti-*Borrelia*-IgM-Serumproben, welche 3 Gefrier-Auftau-Zyklen unterzogen wurden, zeigten keinen Effekt auf die Testergebnisse.

#### 14. Referenzen

1. Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology*, 12/9: 1036-1040.
2. Lyme Disease and Related Tick-Borne infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
3. Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet* 352: 557-565.
4. Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. *Reviews of Infectious Diseases*. 11/6: S1487-S1493.
5. Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. *Option Bio*. 387: 20-21.
6. La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
7. Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001-33: 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 OM/SDe

### 1. Intended Use

The NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test is a rapid qualitative screening test for the detection of human IgG and IgM to European strains of *Borrelia* in human serum and plasma. The test is intended for use as an aid in the diagnosis of Lyme disease, also known as Lyme borreliosis, and is designed for professional use only. However, in the case of a positive result, the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test does not enable the stage of the disease to be determined.

### 2. Introduction and Clinical Significance

Lyme disease (1) or Lyme borreliosis is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato*, which is transmitted by ticks. Contagious ticks, infected by *Borrelia burgdorferi sensu lato*, are mainly found in North America (*Ixodes scapularis* or *Ixodes pacificus*) and in temperate areas of Western Europe (*Ixodes ricinus*). European tick species are vectors of European *Borrelia* strains, such as *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2) as well as *B. spielmanii* and *B. bavariensis*, which are also known to be pathogenic. *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* are also considered to be potentially pathogenic strains. Due to the high similarity amongst *Borrelia* strains, IgG and IgM directed against different *Borrelia* species cross-react with the antigen cocktail of the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test - at least in the case of European strains.

In 30% to 80% of cases, a skin rash (*erythema chronicum migrans*) is the first clinical sign of the infection, appearing after 3 to 10 days at the site of the tick bite. Between 1 and 3 months later, the first neurological signs, such as a headache or severe disorders like myelitis (3), appear - even in the absence of *erythema chronicum migrans*. Patients may also develop severe complications, such as intermittent attacks of articular arthritis, myocarditis or acrodermatitis much later, even several years after the primary infection.

### 3. Test Principle

A unique combination of anti-human immunoglobulins-dye conjugates and highly purified native *B. burgdorferi* and *B. garinii* as well as recombinant *B. burgdorferi* antigens on the solid phase are used in the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test to specifically detect anti-*Borrelia* antibodies.

The NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test comprises a plastic casing containing two internal test strips for the detection of IgG or IgM. After the collection of a plasma or serum specimen, a few drops of the specimen are added to each specimen well (⇒) of the test cassette.

As the specimen migrates along the membrane of the strip (IgM detection), anti-human immunoglobulins-dye conjugates bind to human IgM, forming antibody-antigen complexes. In the same way, the specimen flows along the membrane of the strip (IgG detection), where the anti-human immunoglobulins-dye conjugates bind to the human IgG, forming antibody-antigen complexes. In the case of positive results, these complexes bind to the specific antigens in the test line region(s) of the test cassette and produce (a) rose-pink line(s). In the absence of anti-*Borrelia* antibodies, no lines appear in the test line regions of the test cassette. The reaction mixture continues to migrate along the membranes of the test cassette. Unbound conjugates bind to the reagents

in each control line region, producing a rose-pink line, which demonstrates that the proper volume of specimen has been added and membrane wicking has occurred.

### 4. Reagents and Materials Supplied

- 10 NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM test cassettes (incl. disposable plastic pipettes)
- 1 buffer containing detergent and <0.1% NaN<sub>3</sub> (6 ml)
- 1 package insert

### 5. Additional Materials Required

- Timer

### 6. Storage & Stability

All NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM test kit components should be stored between +4°C and +30°C. The test cassette must remain in the sealed foil pouch until use. Do not freeze the test kit. The NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test is stable until the expiry date stated on the package.

### 7. Warnings and Precautions

- For professional *in-vitro* diagnostic use only.
- Carefully read through the test procedure prior to testing.
- Do not use the test beyond the expiration date indicated on the package.
- Do not use the test if the foil pouch is damaged.
- Do not reuse tests.
- Do not add specimens to the reaction area (result area).
- In order to avoid contamination, do not touch the reaction area (result area).
- Avoid cross-contamination of specimens by using a new specimen collection tube for each specimen obtained.
- Do not substitute or mix components from different test kits.
- Do not eat, drink or smoke in the area where specimens and test kits are handled.
- Wear protective clothing such as laboratory coats, disposable gloves and eye protection when specimens are being assayed.
- Handle all specimens as if they contain infectious agents. Observe established precautions for microbiological risks throughout all procedures and standard guidelines for the appropriate disposal of specimens.
- The test kit contains products of animal origin. Certified knowledge of the origin and/or sanitary state of the animals does not completely guarantee the absence of transmissible pathogenic agents. It is therefore recommended that these products be treated as potentially infectious, and handled in accordance with usual safety precautions (e.g., do not ingest or inhale).
- The diluent contains sodium azide, which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of this solution, always flush with copious amount of water to prevent azide build-up. Avoid contact with eyes or mucous membranes. In the event of accidental contact, wash thoroughly with water.
- Humidity and temperature can adversely affect test results.
- Used testing materials should be discarded according to local regulations.

## 8. Specimen Collection and Preparation

### Serum or plasma (lithium or ammonium heparinate, EDTA)

Specimens should be collected under standard laboratory conditions (i.e., aseptically and in such a way as to avoid haemolysis).

If the test is to be run within 48 hours after specimen collection, specimens should be stored in the refrigerator at 2-8°C. Specimens should be kept frozen if the test is to be performed after more than 48 hours after specimen collection. Frozen specimens must be completely thawed, thoroughly mixed and brought to room temperature prior to testing. Avoid repeated freezing and thawing cycles.

In the case of turbidity, high viscosity or the presence of particulate matter in serum specimens, they should be diluted with an equal volume (V/V) of dilution buffer (not provided but available upon request) prior to testing.

## 9. Test Procedure

### Bring the test cassette, buffer, specimen and/or controls to room temperature (15-30°C) prior to testing.

1. Remove the test cassette from the sealed foil pouch. Label it with the patient's name or control number.
2. Fill a disposable pipette with the serum or plasma specimen. Holding the pipette vertically, dispense 1 drop (25 µL) of the specimen into each specimen well (⇒).
3. Add exactly 6 drops (200 µL) of buffer to each specimen well (⇒).
4. Read the test result after 10 - 15 minutes. Do not interpret the test result after more than 15 minutes.



## 10. Result Interpretation

### Positive for IgG:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'T' for IgG.



### Positive for IgM:

One coloured line develops in each control line region 'C' and one coloured line develops in the test line region 'T' for IgM.



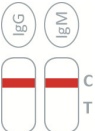
### Positive for IgG and IgM:

In addition to the control lines 'C', a coloured line develops in each test line region 'T' for IgG and IgM.



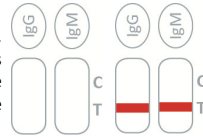
### Negative:

One coloured line appears in each control line region 'C'. No coloured lines appear in the test line regions 'T' for IgG and IgM.



### Invalid:

The control lines 'C' fail to appear. Results from any test which has not produced control lines at the specified reading time must be discarded.



Insufficient specimen volume, incorrect operating procedure or expired tests are the most likely reasons for control line failure. Please review the procedure and repeat the test with a new test cassette. If the problem persists, discontinue using the test kit immediately and contact your distributor.

## 11. Quality Control

### Internal Control:

A coloured line appearing in the control line region 'C' is considered an internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

### External Control:

The use of external positive and negative controls is recommended to ensure proper assay performance.

## 12. Limitations

- The result obtained with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test should not be used as the sole criterion for the diagnosis of Lyme borreliosis.
- Immune response can be late in infected patients. During the primary stage (I) of the disease (6), which is characterised by the development of the *erythema migrans*, IgM may only be detected 2 to 6 weeks following the tick bite, and even then only in 40 to 60% of the cases. During the second stage (II), which corresponds to the development of acute neuroborreliosis, IgM and IgG are detected in 70 to 90% of the cases. Therefore, if a negative result was obtained first time, it is recommended to perform another test 4 to 6 weeks later to check the antibody level. During the third stage of the disease (III), which is characterised by chronic atrophic acrodermatitis and Lyme arthritis, IgM and IgG are usually detectable.
- Some factors, such as a very early stage of infection or previous treatment of the patient by antibiotics may lead to false negative results. This is due to a low *anti-Borrelia* IgM concentration which may not be detected using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.
- In some cases, a positive result could be obtained because of the persistence of IgG or IgM for more than 10 years after treatment (7). Due to observed cross-reactions (see table 2 for IgG and table 8 for IgM in the section 'Cross-reactions and analytical specificity'), such as with anti-CMV antibodies for IgM, it is important to be cautious in the final interpretation of the test result obtained with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.
- Antibody levels may be variable, depending on the patients tested. The prevalence of antibodies in the overall population is close to 3% to 5%, while in exposed subjects (foresters, hikers) antibodies can be detected in 25% to 30% of the cases (5).
- As with any diagnostic procedure, data obtained with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test should be evaluated by the physician in conjunction with other clinical



information, as patients suffering from borreliosis may exhibit symptoms similar to those of syphilis (4).

- The NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test should be used in conjunction with all criteria, such as the historical epidemiological situation in the region, the patient's symptoms as well as test limitations.

### 13. Performance Characteristics

#### Lyme IgG

##### Diagnostic sensitivity and specificity

141 serum specimens from different panels of European origin pre-assayed by EIA method (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin and Enzygnost Dade-Behring) were tested using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.

The results are presented in the following table:

Table 1

		Reference method (EIA)		
		+	-	Total
NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	+	61	11	72
	-	14	55	69
	Total	75	66	141

Performances are calculated from the data presented in the table above as follows:

Sensitivity:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Specificity:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Overall agreement:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Cross-reactions and analytical specificity

Serum specimens containing high levels of anti-*Treponema pallidum* antibodies, rheumatoid factors, anti-EBV, anti-CMV or antinuclear antibodies were tested using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test to evaluate possible interferences. The results are presented in the following table:

Table 2

Positive specimens	Positive results obtained with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	Total number of specimens
Syphilis	0	44
Rheumatoid factor	2	30
anti-EBV antibodies	0	30
anti-CMV antibodies	0	30
antinuclear antibodies	1	30
Total number of specimens	3	164

The results show that cross-reactions may occur with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test if specimens contain high levels of rheumatoid factors or antinuclear antibodies. However, the overall analytical specificity obtained when testing these potentially interfering specimens remains at 98.2% (161/164).

##### Interferences

Serum specimens assayed by ELISA method (Virotech) were spiked with human haemoglobin (2.5 g/L), bilirubin (0.3 g/L) or triglycerides (10 g/L). Using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test, these specimens were tested in parallel also without being spiked.

The results are presented in the following tables respectively:

Table 3

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Reference without haemoglobin	Spiked with 2.5 g/L of haemoglobin
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)		
98 (negative)	5.8 (> 9)	-	-
62 (weak positive)	20.4 (> 9)	+	+
91 (strong positive)	47.5 (> 9)	+	+

Table 4

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Reference without bilirubin	Spiked with 0.3 g/L of bilirubin
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)		
98 (negative)	5.8 (> 9)	-	-
62 (weak positive)	20.4 (> 9)	+	+
91 (strong positive)	47.5 (> 9)	+	+

Table 5

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Reference without triglycerides	Spiked with 10 g/L of triglycerides
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)		
98 (negative)	5.8 (> 9)	-	-
62 (weak positive)	20.4 (> 9)	+	+
91 (strong positive)	47.5 (> 9)	+	+

The results show that haemoglobin, bilirubin and triglycerides do not interfere with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test up to the concentrations of 2.5 g/L, 0.3 g/L and 10 g/L respectively.

#### Lyme IgM

##### Diagnostic sensitivity and specificity

251 serum specimens from different panels of European origin pre-assayed by EIA method (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin and Enzygnost Dade-Behring) were tested using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.

The results are presented in the following table:

Table 6

		Reference method (EIA)		
		+	-	Total
NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	+	139	16	155
	-	14	82	96
	Total	153	98	251

Performances are calculated from the data presented in the table above as follows:

Sensitivity:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Specificity:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Overall agreement:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

### Diagnostic sensitivity in the 3 clinical stages of Lyme disease

A study was performed in a European reference laboratory for *Borreliosis* using serum specimens corresponding to different clinical stages of Lyme disease: stage I characterised by *erythema chronicum migrans* (EM); stage II corresponding to the development of acute neuroborreliosis (NB) and stage III characterised by chronic atrophic acrodermatitis (ACA) and Lyme arthritis (LA).

The results are presented in the following table:

**Table 7**

Stage	Number of specimens	Number of positive specimens		Sensitivity in %
		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	DIASORIN ELISA (cut off: > 1.10)	
EM	40	21	39	53.8
NB	19	2	13	15.4
ACA	31	3	17	17.6

Amongst the tested specimens, 4 specimens of stage I, 5 specimens of stage II and 7 specimens of stage III showed a very IgM weak positive result (titers below 1.5 x cut-off value).

### Cross-reactions and analytical specificity

Serum specimens containing high levels of anti-*Treponema pallidum* antibodies, rheumatoid factors, anti-EBV, anti-CMV or antinuclear antibodies were tested using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test to evaluate possible interferences. The results are presented in the following table:

**Table 8**

Positive specimens	Positive results obtained with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	Total number of specimens
Syphilis	6	53
Rheumatoid factors	1	30
anti-EBV antibodies	3	30
anti-CMV antibodies	9	30
antinuclear antibodies	4	30
Total number of specimens	23	173

The results show that cross-reactions may occur with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test if specimens contain high levels of rheumatoid factors, anti-*Treponema pallidum* antibodies or antinuclear antibodies. However, the overall analytical specificity obtained when testing these potentially interfering specimens remains at 86.7% (150/173).

### Interferences

Serum specimens assayed using different ELISA methods (Diasorin, Euroimmun) were spiked with human haemoglobin (5 g/L), bilirubin (0.3 g/L) or triglycerides (30 g/L). Using the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test, these specimens were tested in parallel also without being spiked.

The results are presented in the following tables respectively:

**Table 9**

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)	Reference without haemoglobin	Spiked with 5 g/L of haemoglobin
		19 (negative)	6.9 (> 22)
43 (weak positive)	1.6 (> 0.8)	+	+
39 (strong positive)	5.6 (> 0.8)	+	+

**Table 10**

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)	Reference without bilirubin	Spiked with 0.3 g/L of bilirubin
		19 (negative)	6.9 (> 22)
43 (weak positive)	1.6 (> 0.8)	+	+
39 (strong positive)	5.6 (> 0.8)	+	+

**Table 11**

Specimens titrated using ELISA method		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Number of specimens	Titer in UA/mL (Cut-off)	Reference without triglycerides	Spiked with 30 g/L of triglycerides
		19 (negative)	6.9 (> 22)
43 (weak positive)	1.6 (> 0.8)	+	+
39 (strong positive)	5.6 (> 0.8)	+	+

The results show that haemoglobin, bilirubin and triglycerides do not interfere with the NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test up to the concentrations of 5 g/L, 0.3 g/L and 30 g/L respectively.

### Effect of freeze-thaw cycles

Negative, weak positive and strong positive anti-*Borrelia* IgM serum specimens having undergone 3 freeze-thaw cycles did not demonstrate any effect on the test results.

### 14. References

- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-Borne infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352 : 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6 : S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borrellose de Lyme. Option Bio. 387 : 20-21.
- La borrellose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
- Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33 : 780-5.

### 1. Domaine d'application

Le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM est un test rapide pour la détection qualitative des IgG et IgM humains sur des souches de *Borrelia* dans les échantillons de sérum et de plasma humain. Ce test est une aide lors du diagnostic de la borréliose de Lyme, également connu sous le nom de la maladie de Lyme. En cas de résultat positif, le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM ne permet cependant pas de définir le stade de la maladie.

### 2. Introduction et signification clinique

La borréliose de Lyme ou maladie de Lyme (1) est provoquée par l'agent pathogène *Borrelia burgdorferi sensu lato*, lequel est transmis par la tique. Les insectes infectés par le *Borrelia burgdorferi sensu lato* se propagent principalement en Amérique du Nord (*Ixodes scapularis* ou *I. pacificus*) et dans les zones tempérées d'Europe occidentale (*Ixodes ricinus*). Le type européen de tiques est le déclencheur de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelli* et *B. garinii* (2) ainsi que *B. spielmanii* et *B. bavariensis*, agents pathogènes reconnus. *B. valaisiana* et *B. lusitanae* sont aussi considérés comme de potentiels agents pathogènes. En raison de la grande similitude entre les souches de *Borrelia*, les IgG et IgM, eux-même dirigés vers différentes espèces de *Borrelia*, provoquent des réactions croisées avec le cocktail d'antigènes du test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Dans 30 % à 80 % des cas, une éruption cutanée ou un érythème migrant (*Erythema chronicum migrans*) sont les premiers signes d'infection. Ils apparaissent dans les 3 à 10 jours au niveau de la piquûre de la tique. Les premiers signes neurologiques apparaissent après 1 à 3 mois, notamment : maux de tête ou douleurs aiguës et inflammation de la moelle épinière (3), même en l'absence d'un érythème migrant. Quelques années après la primo-infection, les patients peuvent souffrir de douleurs aiguës dues à une arthrite temporaire, à des crampes musculaires ou des inflammations cutanées.

### 3. Principe du test

Le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM utilise la combinaison unique d'un conjugué coloré anti-immunoglobulines humaines et d'antigènes purifiés *B. burgdorferi*- et *B. garinii*- ainsi que d'antigènes recombinants *B. burgdorferi* en phase solide pour détecter les anticorps anti-*Borrelia*.

Le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM se compose d'un boîtier en plastique avec deux bandelettes différentes pour la détection d'IgG et/ou d'IgM. Suite au recueil des échantillons de plasma ou de sérum, quelques gouttes de l'échantillon sont ajoutées à chaque puits de dépôt (→) de la cassette. L'échantillon migre le long de la membrane de la bandelette (détection des IgM), le conjugué coloré anti-immunoglobulines humaines se lie à des IgG humains formant un complexe anticorps-antigènes. De la même manière, l'échantillon continue de migrer le long de la membrane de la bandelette (détection des IgG), le conjugué coloré anti-immunoglobulines humaines se lie à des IgG humains formant un complexe anticorps-antigènes. Dans le cas de résultats positifs, ces complexes se lient aux antigènes spécifiques à hauteur des lignes de test de la cassette et

gène une ligne de couleur rose. En l'absence d'anticorps anti-*Borrelia*, aucune ligne n'apparaît à hauteur des lignes de test de la cassette. Le mélange continue de migrer le long de la membrane de la cassette. Les conjugués non-liés se lient à des réactifs à hauteur de toutes les zones de contrôle générant une/des ligne/s de couleur rose prouvant qu'une quantité nécessaire d'échantillons a été ajoutée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

### 4. Réactifs et matériel fournis

- 10 cassettes NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (pipettes à usage unique incluses)
- 1 flacon de solution tampon « Buffer » (6 mL) (contenant un détergent et de l'azote de sodium (Na<sub>3</sub> < 0,1 %)
- 1 notice d'utilisation

### 5. Matériel supplémentaire nécessaire

- Chronomètre

### 6. Péremption et conservation des réactifs

Tous les composants du kit NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM doivent être conservés entre +4°C et +30°C. Conserver la cassette dans son emballage fermé jusqu'à utilisation. Ne pas congeler les kits. Le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM reste stable jusqu'à la date de péremption inscrite sur l'emballage.

### 7. Avertissement et précautions

- Test réservé au diagnostic *in-vitro* professionnel.
- Veiller à lire attentivement la notice d'utilisation avant de réaliser le test.
- Ne pas utiliser le test après la date de péremption indiquée sur l'emballage.
- Ne pas utiliser le test si l'emballage est endommagé.
- Test à usage unique.
- Ne pas déposer de prélèvement sur la zone réactive (fenêtre de résultats).
- Ne pas toucher la zone réactive afin d'éviter toute contamination.
- Pour éviter toute contamination croisée, utiliser un tube collecteur unique pour chaque échantillon.
- Ne pas interchanger ou mélanger le matériel de différents kits.
- Ne pas manger, boire ou fumer à proximité de la zone de manipulation des tests.
- Utiliser des vêtements de protection tels qu'une blouse de laboratoire, des gants à usage unique et des lunettes de protection.
- Manipuler les échantillons en les considérant comme de potentiels réactifs infectieux. Respecter les précautions relatives aux risques microbiologiques pendant les manipulations ainsi que les directives locales en vigueur concernant l'élimination des déchets.
- Ce test contient des produits d'origine animale. La certification concernant l'origine et l'état sanitaire des animaux ne certifie pas l'absence totale d'agents pathogènes transmissibles. Tous les échantillons et matériaux utilisés pour ce test doivent être considérés comme des matières infectieuses. Il est recommandé d'appliquer les mesures de précaution nécessaires (ne pas avaler ou inhaler).

- La solution tampon contient de l'azote de sodium qui, au contact de canalisations en cuivre ou en plomb, peut former des acides explosifs. Au moment de l'élimination de la solution tampon, nettoyer abondamment avec de l'eau, afin d'éviter un dépôt excessif d'acides. Éviter tout contact avec les yeux ou les muqueuses. Dans le cas d'une mise en contact accidentelle, rincer abondamment avec de l'eau.
- L'humidité et les températures peuvent affecter les résultats du test.
- Les matériaux du test utilisés doivent être éliminés selon les normes en vigueur.

### 8. Recueil, préparation et conservation des échantillons

#### Sérum, plasma (lithium héparine ou ammonium héparine, EDTA)

L'échantillon doit être recueilli conformément aux normes standards de laboratoire (ascéptique et en évitant une hémolyse).

Si le test doit être réalisé dans les 48 heures qui suivent le recueil, conserver les échantillons au réfrigérateur entre 2-8°C.

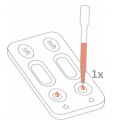
Les échantillons doivent être congelés si le test est réalisé après 48 heures. Décongeler les échantillons avant toute utilisation, amener à température ambiante et mélanger. Ne pas répéter les cycles de congélation-décongélation.

Si les échantillons de sérum sont troubles, très visqueux ou présentent des grumeaux, recommencer le test avec le même volume (V/V) de diluant (non fourni dans le kit. Disponible sur demande) avant d'exécuter un nouveau test.

### 9. Exécution du test

#### Amener la cassette, la solution tampon, les échantillons et/ou les contrôles à température ambiante (15-30°C) avant de réaliser le test.

1. Sortir la cassette de son emballage fermé et utiliser celle-ci dès que possible. Indiquer sur la cassette le nom du patient ou un numéro de contrôle.
2. Remplir la pipette d'échantillon de sérum ou de plasma. Tenir la pipette à la verticale et laisser tomber une goutte de plasma ou de sérum (25 µL) dans le puits de dépôt de la cassette (⇒).
3. Ajouter 6 gouttes (200 µL) de solution tampon à chaque puits de dépôt (⇒).



10-15 min

4. Lire les résultats du test après 10-15 minutes. Ne plus interpréter les résultats après 15 minutes.

### 10. Interprétation des résultats

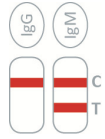
#### Positif à IgG :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque ligne de contrôle «C» et une ligne colorée apparaît à hauteur de la ligne de test «T» pour IgG.



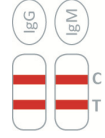
#### Positif à IgM :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de chaque ligne de contrôle «C» et une ligne colorée apparaît à hauteur de la ligne de test «T» pour IgM.



#### Positif à IgG et IgM :

En plus des lignes de contrôle «C», une ligne colorée apparaît à hauteur des lignes de test «T» pour IgG et IgM.



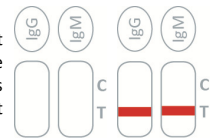
#### Négatif :

Une ligne colorée apparaît à hauteur de la ligne de contrôle «C». Aucune ligne colorée n'apparaît à hauteur des lignes de test «T» pour IgG et IgM.



#### Non-valide :

La ligne de contrôle «C» n'apparaît pas. Les tests sur lesquels aucune ligne de contrôle n'est apparue dans le temps d'évaluation fixé doivent être jetés.



Les tests sur lesquels aucune ligne de contrôle n'est apparue dans le temps d'évaluation fixé doivent être jetés. Contrôler la procédure d'exécution du test et répéter le test avec une nouvelle cassette. Si le problème persiste, ne plus utiliser le kit et contacter le distributeur.

### 11. Contrôle qualité

#### Contrôle interne :

La ligne colorée apparaissant au niveau de la zone de contrôle «C» est considérée comme un contrôle interne. Cette ligne confirme que le volume d'échantillon était suffisant, que la manipulation a été correctement effectuée et que la membrane a été suffisamment imbibée.

#### Contrôle externe :

Il est conseillé de réaliser des contrôles positifs et négatifs pour confirmer la performance des tests.

### 12. Limites du test

- Les résultats obtenus avec le test NADAL® Lyme Borreliosis Test IgG/IgM ne devrait pas être le seul critère lors du diagnostic de la borreliose de Lyme.
- Chez les patients infectés, une réaction peut survenir immunitaire plus tard. Pendant le premier stade (I) de la maladie (6), caractérisée par le développement de *Erythema migrans*, les IgM ne peuvent être détectés que dans les 2 à 6 semaines suivant la morsure de la tique. Ils ne seront détectés que dans 40% à 60% des cas. Pendant le deuxième stade, indiquant le développement d'une neuroborreliose aiguë, les IgM et les IgG peuvent être détectés dans 70% à 90% des cas. En présence d'un résultat négatif, il est conseillé de réaliser un nouveau test dans les 4 à 6 semaines suivantes afin de vérifier le taux d'anticorps. Pendant le troisième stade de la maladie (III), caractérisée

par une acrodermatite chronique atrophiante et une arthrite de Lyme, les IgM et les IgG sont détectables.

- Certains facteurs, comme des stades anticipés de l'infection ou un traitement antibiotique antérieur, peuvent mener à des faux négatifs. Dans ce cas, le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM n'est pas en mesure de détecter les concentrations très faibles en IgM anti-*Borrelia*.
- Dans certains cas, un résultat positif pourrait être obtenu plus de 10 ans après le traitement, les IgG et en IgM étant très persistants (7). Au vu de réactions croisées observées (voir le tableau 2 pour IgG et le tableau 8 pour IgM dans le paragraphe « Réactions croisées et spécificité analytique »), notamment avec des anticorps anti-CMV, il est important d'interpréter les résultats définitifs obtenus avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM avec précaution.
- Les concentrations en anticorps peuvent varier et dépendre selon les patients testés. La prévalence d'anticorps au sein de la population se situe à peu près entre 3% et 5%, tandis que des anticorps présents chez les humains fortement exposés aux borrelies (gardes forestiers, randonneurs) sont détectés dans 25% à 30% des cas (5).
- Tout résultat de diagnostic obtenu avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM doit être évalué en fonction des données cliniques supplémentaires, car les patients atteints de la borreliose peuvent présenter des symptômes similaires à ceux de la syphilis (4).
- Le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM doit être utilisé au regard de tous les critères, comme par exemple, de la situation historique et épidémiologique de la région donnée, des symptômes des patients ainsi que des limites du test.

Borreliosis IgG/IgM, afin d'évaluer de possibles interférences. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2

Échantillons positifs	Résultats positifs (IgG) obtenus avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM	Quantité globale d'échantillons
Syphilis	0	44
Facteurs rhumatoïdes	2	30
Anticorps anti-EBV	0	30
Anticorps anti-CMV	0	30
Anticorps anti-nucléaires	1	30
Quantité globale d'échantillons	3	164

Les résultats montrent que des réactions croisées avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM peuvent survenir quand les échantillons présentent une haute concentration en facteurs rhumatoïdes ou en anticorps anti-nucléaires. La spécificité analytique générale obtenue lors du test de ces échantillons potentiellement interférents, est malgré tout de 98,2% (161/164).

### Interférences

Les échantillons de sérum, testés à l'aide de la méthode ELISA (Virotech), ont été mélangés avec de l'hémoglobine humaine (2,5 g/L), de la bilirubine (0,3 g/L) ou des triglycérides (10 g/L). Ces échantillons ont été testés parallèlement avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, sans adjonction de ces substances.

Les résultats sont respectivement présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3

Échantillons titrés avec la méthode ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (cut-off)	Référence sans hémoglobine	Mélangé avec 2,5 g/L d'hémoglobine
98 (négatif)	5,8 (> 9)	-	-
62 (faible positif)	20,4 (> 9)	+	+
91 (fort positif)	47,5 (> 9)	+	+

Tableau 4

Échantillons titrés avec la méthode ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (cut-off)	Référence sans bilirubine	Mélangé avec 0,3 g/L de bilirubine
98 (négatif)	5,8 (> 9)	-	-
62 (faible positif)	20,4 (> 9)	+	+
91 (fort positif)	47,5 (> 9)	+	+

## 13. Performance du test

### Lyme-IgG

#### Sensibilité et spécificité diagnostiques

141 échantillons de sérum provenant d'un panel de l'Europe entière et testés au préalable à l'aide de la méthode EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin et Enzygnost Dade-Behring) ont été utilisés avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)		Méthode de référence (EIA)		
		+	-	Total
	+	61	11	72
-	14	55	69	
Total	75	66	141	

Les performances du test résultant des données présentées dans le tableau ci-dessus, sont calculées comme suit :

Sensibilité :  $61/75 \times 100 = 81\%$

Spécificité :  $55/66 \times 100 = 83\%$

Performance générale :  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

#### Réactions croisées et spécificité analytique

Les échantillons de sérum présentant de fortes concentrations en anticorps anti-*Treponema pallidum*, en facteurs rhumatoïdes ainsi qu'en anticorps anti-EBV, anti-CMV et anti-nucléaires ont été testés avec le test NADAL® Lyme

Tableau 5

Échantillons titrés avec la méthode ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Référence sans triglycérides	Mélangé avec 10 g/L de triglycérides
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (Valeur cut-off)			
98 (négatif)	5,8 (> 9)	-	-	-
62 (faible positif)	20,4 (> 9)	+	+	+
91 (fort positif)	47,5 (> 9)	+	+	+

Les résultats montrent que l'hémoglobine, la bilirubine et les triglycérides n'interfèrent pas avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM dans les concentrations suivantes, respectivement : 2,5 g/L, 0,3 g/L et 10 g/L.

### Lyme-IgM

#### Sensibilité et spécificité diagnostiques

251 échantillons de sérum provenant d'un panel de l'Europe entière et testés au préalable à l'aide de la méthode EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin et Enzygnost Dade-Behring) ont été utilisés avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Méthode de référence (EIA)		
	+	-	Total
	+	139	16
-	14	82	96
Total	153	98	251

Les performances du test résultant des données présentées dans le tableau ci-dessus, sont calculées comme suit :

Sensibilité :  $139/153 \times 100 = 91\%$

Spécificité :  $82/98 \times 100 = 84\%$

Performance générale :  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

#### Sensibilité diagnostique aux trois stades cliniques de la maladie de Lyme (Borréliose)

Une étude sur l'utilisation d'échantillons de sérum pour la détection de la borréliose a été menée dans un laboratoire de référence européen. Elle a établi trois stades cliniques différents pour la maladie de Lyme : Stade I, caractérisé par *Erythema chronicum migrans* (EM) Stade II, correspondant à l'évolution d'une neuroborréliose aiguë (NB) et stade III, caractérisé par une acrodermatite chronique atrophiante (ACA) et une arthrite de Lyme (LA). Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 7

Stade	Quantité d'échantillon	Quantité d'échantillons positifs		Sensibilité en %
		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	DIASORIN ELISA (Valeur cut-off : > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Parmi les échantillons testés, 4 échantillons du stade I, 5 du stade II et 7 du stade III étaient faibles positifs (titres en-deçà d'une valeur cut-off de 1,5).

#### Spécificité analytique

Les échantillons de sérum présentant de fortes concentrations en anticorps anti-*Treponema pallidum*, en facteurs rhumatoïdes ainsi qu'en anticorps anti-EBV, anti-CMV et anti-nucléaires ont été testés avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, afin d'évaluer de possibles interférences. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 8

Échantillons positifs	Résultats positifs (IgM) obtenus avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM	Quantité globale d'échantillons
Syphilis	6	53
Facteurs rhumatoïdes	1	30
Anticorps anti-EBV	3	30
Anticorps anti-CMV	9	30
Anticorps anti-nucléaires	4	30
Quantité globale d'échantillons	23	173

Les résultats montrent que des réactions croisées avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM peuvent survenir quand les échantillons présentent une haute concentration en facteurs rhumatoïdes, en anticorps anti-*Treponema pallidum* ou antinucléaires. La spécificité analytique générale obtenue lors du test de ces échantillons potentiellement interférents, est malgré tout de 86,7% (150/173).

#### Interférences

Les échantillons de sérum, testés à l'aide de méthodes ELISA (Diasorin, Euroimmun), ont été mélangés avec de l'hémoglobine (5 g/L), de la bilirubine (0,3 g/L) ou des triglycérides (30 g/L). Ces échantillons ont été testés parallèlement avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, sans adjonction de ces substances.

Les résultats sont respectivement présentés dans le tableau suivant :

Tableau 9

Échantillons titrés avec la méthode ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (valeur cut-off)	Référence sans hémoglobine	Mélangé avec 5 g/L d'hémoglobine
19 (négatif)	6,9 (> 22)	-	-
43 (faible positif)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (fort positif)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tableau 10

Échantillons titrés avec la méthode ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (cut-off)	Référence sans bilirubine	Mélangé avec 0,3 g/L de bilirubine
19 (négatif)	6,9 (> 22)	-	-
43 (faible positif)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (fort positif)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tableau 11

ELISA-Méthode		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Quantité d'échantillons	Titres en UA/mL (Valeur cut-off)	Référence sans triglycérides	Mélangé avec 30 g/L de triglycérides
19 (négatif)	6,9 (> 22)	-	-
43 (faible positif)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (fort positif)	5,6 (> 0,8)	+	+

Les résultats montrent que l'hémoglobine, la bilirubine et les triglycérides n'interfèrent pas avec le test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM dans les concentrations suivantes, respectivement : 5 g/L, 0,3 g/L et 30 g/L.

#### Effets des cycles de congélation-décongélation

Les échantillons de sérum négatifs, faible positifs et fort positifs anti-*Borrelia*-IgM, soumis à trois cycles de congélation-décongélation, n'ont pas eu d'influence sur les résultats des tests.

#### 14. Bibliographie

1. Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology*, 12/9: 1036-1040.
2. Lyme Disease and Related Tick-Borne infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
3. Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet* 352 : 557-565.
4. Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. *Reviews of Infectious Diseases*. 11/6 : S1487-S1493.
5. Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. *Option Bio*. 387 : 20-21.
6. La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
7. Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001- 33 : 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 CC

### 1. Uso previsto

El test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM es un inmunoensayo cualitativo rápido para la detección de IgG e IgM de cepas europeas de *Borrelia* en muestras humanas de suero y plasma. Este test sirve para ayudar en el diagnóstico de la enfermedad de Lyme, también conocida como borreliosis de Lyme, y solo está indicado para el uso profesional. Sin embargo, en caso de resultado positivo, el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM no permite determinar la fase de la enfermedad.

### 2. Introducción y significado clínico

La enfermedad de Lyme (1), o borreliosis de Lyme, está causada por la espiroqueta *Borrelia burgdorferi sensu lato*, que es transmitida por garrapatas. Las garrapatas contagiosas, infectadas por *Borrelia burgdorferi sensu lato*, se encuentran principalmente en Norteamérica (*Ixodes scapularis* o *Ixodes pacificus*) y en las áreas templadas del oeste europeo (*Ixodes ricinus*). Las especies europeas de garrapata son vectores de las cepas europeas de *Borrelia*, como la *burgdorferi sensu stricto*, la *B. afzelii*, la *B. garinii* (2) así como la *B. spielmanii* y la *B. bavariensis*, también consideradas como patógenas. La *B. lusitana* y la *B. lusitanae* también se consideran cepas potencialmente patógenas. Debido a la gran similitud entre las cepas de *Borrelia*, las IgG e IgM dirigidas contra diferentes especies de *Borrelia* presentan reacciones cruzadas con el cóctel de antígenos del test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, al menos en el caso de cepas europeas.

En un 30-80% de los casos, presentan como principal signo clínico de la infección una erupción cutánea (*Erythema chronicum migrans*), que aparece en los 3-10 días posteriores en la zona de la picadura de garrapata. Entre 1 y 3 meses después aparecen las primeras señales neurológicas, como dolor de cabeza o graves desórdenes como mielitis (3), incluso en ausencia de *Erythema chronicum migrans*. Tras la infección, los pacientes también pueden desarrollar graves complicaciones, como ataques intermitentes de artritis articular, miocarditis o más tarde acrodermatitis, incluso varios años después de la infección primaria.

### 3. Principio del test

Para la detección específica de anticuerpos anti-*Borrelia*, el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM utiliza una única combinación de conjugados coloreados de inmunoglobulinas antihumanas locales altamente purificadas *B. burgdorferi* y *B. garinii*, así como de antígenos *B. burgdorferi* recombinantes en la fase sólida.

El dispositivo consta de un casete de plástico con dos tiras reactivas internas para la detección de IgG e IgM. Tras la extracción de plasma o suero, se añaden unas pequeñas gotas de muestra en cada pocillo (⇒) del casete.

A medida que la muestra migra a través de la membrana de la tira (detección de IgM), el conjugado coloreado de inmunoglobinas antihumanas se une al IgM humano, formando un complejo anticuerpo- antígeno. Del mismo modo, la muestra fluye a través del dispositivo absorbente de la tira (detección de IgG), donde los conjugados coloreados de inmunoglobinas antihumanas se unen a los IgG humanos, formando complejos anticuerpo-antígeno. En caso de resultados positivos, estos complejos se unen a los antígenos específicos en la(s) región(es) de test generando una(s)

línea(s) rosa(s). Si no hay anticuerpos anti-*Borrelia*, no aparecerá ninguna línea en las regiones de test del casete. La mezcla continúa fluyendo a través de las membranas del casete. El conjugado sin consolidar se une a los reactivos en cada región de control, produciendo una línea rosa, la cual demuestra que el volumen de muestra ha sido adecuado y que la membrana se ha empapado suficientemente.

### 4. Reactivos y materiales provistos

- 10 test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM en formato casete (con pipetas de plástico desechables incluidas)
- 1 búfer con detergente y <0,1% de NaN<sub>3</sub> (6 ml)
- 1 manual de instrucciones

### 5. Otros materiales necesarios

- Cronómetro

### 6. Almacenamiento y conservación

Todos los componentes del kit NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM deben ser almacenados a una temperatura entre 4-30°C en su envase sellado hasta su uso. No congele los dispositivos. El test se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

### 7. Advertencias y precauciones

- Solo apto para uso profesional de diagnóstico *in-vitro*.
- Lea atentamente las instrucciones del prospecto antes de comenzar el test.
- No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en el envase.
- No utilice el test si la bolsa está dañada.
- No reutilice los test.
- No deposite la muestra en la zona de reacción (región de resultados).
- Evite tocar la zona de reacción (región de resultados), para no contaminarla.
- Evite la contaminación cruzada de las muestras utilizando un nuevo tubo recolector para cada muestra.
- No intercambie ni mezcle componentes de lotes diferentes.
- No coma, beba o fume en la zona de manipulación de las muestras y realización del test.
- Utilice ropa protectora, como bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección, mientras manipule las muestras.
- Trate todas las muestras como si contuviesen agentes infecciosos. Siga durante todo el procedimiento las precauciones establecidas para riesgos microbiológicos y las directrices estándar para la correcta eliminación de las muestras.
- Este test contiene productos de origen animal. El conocimiento certificado del origen y/o estado sanitario de los animales no garantiza completamente la ausencia de agentes patógenos transmisibles. Por esta razón, se recomienda tratar estos productos como potencialmente infecciosos y seguir las medidas de seguridad habituales durante su manipulación (p.ej. no ingerir ni inhalar).
- El diluyente contiene azida de sodio, que puede reaccionar con el plomo o el cobre de las tuberías, formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Cuando deseché esta solución, deje correr abundante cantidad de agua para prevenir la formación de azidas. Evite el contacto con los



ojos o las membranas mucosas. En caso de contacto accidental, lávese con abundante agua.

- La humedad y la temperatura pueden afectar negativamente a los resultados.
- Los materiales utilizados deben eliminarse de acuerdo a las regulaciones locales.

**8. Recolección de muestras y preparación**

**Suero o plasma (litio o heparinato de amonio, EDTA)**

Las muestras deben recolectarse en condiciones estándar de laboratorio (asépticamente y de forma que se evite la hemólisis).

Si el test se realiza dentro de las 48 horas posteriores a su recolección, almacene las muestras en el refrigerador a 2-8°C. Si el test va a ser realizado después de 48 horas, las muestras deberán mantenerse congeladas. En este caso, descongélelas completamente, mézclelas bien y llévelas a temperatura ambiente antes de realizar el test. Evite congelar y descongelar las muestras repetidamente.

En caso de turbiedad, alta viscosidad o presencia de partículas en las muestras de suero, deberán diluirse con un volumen igual (V/V) de búfer diluyente (no proporcionado, pero disponible bajo pedido) antes de realizar la prueba.

**9. Procedimiento del test**

Lleve el casete de test, búfer, muestra y/o controles a temperatura ambiente (15-30°C) antes de realizar el test.

1. Retire el casete de test de su envase sellado. Etiquételo con el nombre o número de control del paciente.
2. Rellene una pipeta desechable con la muestra de suero o plasma. Sujetando la pipeta en posición vertical, dispense 1 gota (25 µL) de muestra en cada pocillo (⇒).
3. Dispense exactamente 6 gotas de búfer (200 µL) en cada pocillo (⇒).
4. Lea los resultados a los 10-15 minutos. No interprete los resultados después de 15 minutos.



**10. Interpretación del resultado**

**Positivo para IgG:**

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "T" para IgG.

**Positivo para IgM:**

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C" y una línea coloreada en la región de test "T" para IgM.

**Positivo para IgG e IgM:**

Además de las líneas de control "C", aparece una línea coloreada en cada región de test "T" para IgG e IgM.

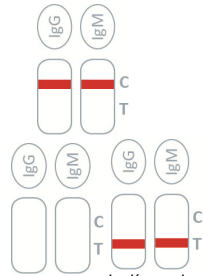


**Negativo:**

Aparece una línea coloreada en cada región de control "C". No aparecen líneas coloreadas en las regiones de test "T" para IgG e IgM.

**No válido:**

No aparecen las líneas de control "C". Si no aparecen las líneas de control dentro del tiempo de lectura especificado, los resultados deben ser descartados.



Las causas más frecuentes de que no aparezca la línea de control son un volumen de muestra insuficiente, un procedimiento incorrecto o que el dispositivo esté caducado. En ese caso, revise el procedimiento y repita el test con un nuevo casete. Si el problema persiste, deje de usar el kit inmediatamente y contacte con su distribuidor.

**11. Control de calidad**

**Control interno:**

La línea coloreada que aparece en la región de control "C" sirve de control interno del procedimiento. Esta línea confirma que el volumen de muestra ha sido adecuado, que la membrana se ha empapado suficientemente y que el procedimiento ha sido correcto.

**Control externo:**

Se recomienda el uso de controles externos positivos y negativos para asegurar el funcionamiento adecuado del test.

**12. Limitaciones**

- El resultado obtenido con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM no debe utilizarse como único criterio para el diagnóstico de borreliosis de Lyme.
- La respuesta inmune en pacientes infectados puede llegar tarde. Durante la fase primaria (I) de la enfermedad (6), que se caracteriza por el desarrollo del *Erythema migrans*, la IgM solo se puede detectar de 2 a 6 semanas después de la picadura de garrapata, y solo en el 40-60% de los casos. Durante la segunda fase (II), que se corresponde con el desarrollo de la neuroborreliosis aguda, se detecta IgM e IgG en el 70-90% de los casos. Por lo tanto, si se obtuvo un resultado negativo la primera vez, se recomienda realizar otro test entre 4 y 6 semanas después para verificar el nivel de anticuerpos. Durante la tercera fase de la enfermedad (III), que se caracteriza por la acrodermatitis atrófica crónica y la artritis de Lyme, la IgM e IgG son generalmente detectables.
- Algunos factores, como una fase muy temprana de la infección o el tratamiento previo del paciente con antibióticos pueden dar lugar a resultados falsos negativos. Esto se debe a una baja concentración de IgM *anti-Borrelia* que no puede ser detectada usando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- En algunos casos, se podría obtener un resultado positivo debido a la persistencia de IgG o IgM durante más de 10 años después del tratamiento (7). Debido a las reacciones cruzadas observadas (véase la tabla 2 para el IgG y la tabla 8 para el IgM en la sección "Reacciones cruzadas y especificidad analítica"), como en el caso de los anticuerpos anti-CMV para la IgM, es importante tener cuidado en la

interpretación final del resultado obtenido con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

- Los niveles de anticuerpos pueden ser variables, dependiendo de los pacientes examinados. La prevalencia de anticuerpos en la población general es cercana al 3-5%, mientras que en personas expuestas (agentes forestales, excursionistas...) los anticuerpos pueden ser detectados en el 25-30% de los casos (5).
- Como en cualquier procedimiento de diagnóstico, el médico debe evaluar los resultados de este test junto con otra información clínica, ya que los pacientes que sufren borreliosis podrían presentar síntomas similares a los de la sífilis (4).
- El test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM debe tenerse en cuenta junto a todos los demás criterios, tales como la situación epidemiológica histórica de la región, los síntomas del paciente y las limitaciones del test.

### 13. Características del rendimiento

#### Lyme IgG

##### Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

Se analizaron 141 muestras de suero de diferentes paneles de origen europeo, preanalizadas con el método EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin y Enzygnost Dade-Behring), con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1

Test NADAL® Lyme Borreliosis Test IgG/IgM (IgG)	Método de referencia (EIA)		
	+	-	Total
	+	61	11
-	14	55	69
Total	75	66	141

Se calculó el rendimiento a partir de los datos presentados en la tabla anterior de este modo:

Sensibilidad:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Especificidad:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Acuerdo general:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Reacciones cruzadas y especificidad analítica

Las muestras de suero que contienen altos niveles de anticuerpos *anti-Treponema pallidum*, factores reumatoides, anticuerpos anti-EBV, anti-CMV o antinucleares fueron analizadas usando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM para evaluar posibles interferencias. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 2

Muestras positivas	Resultados positivos obtenidos con el Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Número total de muestras
Sífilis	0	44
Factor reumatoide	2	30
Anticuerpos anti-EBV	0	30
Anticuerpos anti-CMV	0	30
Anticuerpos antinucleares	1	30
Número total de muestras	3	164

Los resultados muestran que pueden producirse reacciones cruzadas con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM si las muestras contienen altos niveles de factores reumatoides o anticuerpos antinucleares. Sin embargo, la especificidad analítica general obtenida al analizar estas muestras potencialmente interferentes se mantiene en el 98,2% (161/164).

##### Interferencias

Las muestras de suero analizadas por el método ELISA (Virotech) fueron enriquecidas con hemoglobina humana (2,5 g/L), bilirrubina (0,3 g/L) o triglicéridos (10 g/L). Estas muestras fueron analizadas también en paralelo sin ser enriquecidas utilizando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas respectivamente:

Tabla 3

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Número de muestras	Título en UA/mL (punto de corte)	Referencia sin hemoglobina	Enriquecidas con 2,5 g/L de hemoglobina
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (positivo débil)	20,4 (> 9)	+	+
91 (positivo fuerte)	47,5 (> 9)	+	+

Tabla 4

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Número de muestras	Título en UA/mL (punto de corte)	Referencia sin bilirrubina	Enriquecidas con 0,3 g/L de bilirrubina
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (positivo débil)	20,4 (> 9)	+	+
91 (positivo fuerte)	47,5 (> 9)	+	+

Tabla 5

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Número de muestras	Título en UA/mL (punto de corte)	Referencia sin triglicéridos	Enriquecidas con 10 g/L de triglicéridos
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (positivo débil)	20,4 (> 9)	+	+
91 (fuerte positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Los resultados muestran que la hemoglobina, la bilirrubina y los triglicéridos no interfieren con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM hasta las concentraciones de 2,5 g/L, 0,3 g/L y 10 g/L respectivamente.

## Lyme IgM

### Sensibilidad y especificidad de diagnóstico

Se analizaron 251 muestras de suero de diferentes paneles de origen europeo, preanalizadas con el método EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin y Enzygnost Dade-Behring), utilizando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6

Test NADAL® Lyme Borreliosis Test IgG/IgM (IgM)	Método de referencia (EIA)		
	+	-	Total
	+	139	16
-	14	82	96
Total	153	98	251

Los rendimientos se calculan a partir de los datos presentados en la tabla anterior de este modo:

Sensibilidad:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Especificidad:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Acuerdo general:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

### Sensibilidad diagnóstica en las 3 fases clínicas de la enfermedad de Lyme

Se realizó un estudio en un laboratorio europeo de referencia para la *Borreliosis* utilizando muestras de suero correspondientes a diferentes fases clínicas de la enfermedad de Lyme: fase I caracterizada por *erythema chronicum migrans* (EM), fase II correspondiente al desarrollo de la neuroborreliosis aguda (NB) y la fase III caracterizada por la acrodermatitis atrófica crónica (ACA) y la artritis de Lyme (LA).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 7

Fase	Número de muestras	Número de muestras positivas		Sensibilidad en %
		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	DIASORIN ELISA (punto de corte: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Entre las muestras analizadas, 4 muestras de la fase I, 5 muestras de la fase II y 7 muestras de la fase III mostraron un resultado positivo muy débil de IgM (títulos por debajo de 1,5 veces del valor de corte).

### Reacciones cruzadas y especificidad analítica

Las muestras de suero que contienen altos niveles de anticuerpos anti-*Treponema pallidum*, factores reumatoides, anticuerpos anti-EBV, anti-CMV o anticuerpos antinucleares fueron analizadas usando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM para evaluar posibles interferencias. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 8

Muestras positivas	Resultados positivos obtenidos con el Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Número total de muestras
Sifilis	6	53
Factores reumatoides	1	30
Anticuerpos anti-EBV	3	30
Anticuerpos anti-CMV	9	30
Anticuerpos antinucleares	4	30
Número total de muestras	23	173

Los resultados muestran que pueden producirse reacciones cruzadas con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM si las muestras contienen altos niveles de factores reumatoides, anticuerpos anti-*Treponema pallidum* o anticuerpos antinucleares. Sin embargo, la especificidad analítica general obtenida al analizar estas muestras potencialmente interferentes se mantiene en el 86,7% (150/173).

### Interferencias

Las muestras de suero analizadas con diferentes métodos ELISA (Diasorin, Euroimmune) fueron enriquecidas con hemoglobina humana (5 g/L), bilirrubina (0,3 g/L) o triglicéridos (30 g/L). Utilizando el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, estas muestras fueron analizadas también en paralelo sin ser enriquecidas.

Los resultados se muestran en las siguientes tablas respectivamente:

Tabla 9

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Número de muestras	Título en UA/mL (Punto de corte)	Referencia sin hemoglobina	Enriquecidas con 5 g/L de hemoglobina
19 (negativo)	6,9 (> 2,2)	-	-
43 (positivo débil)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (positivo fuerte)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabla 10

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Número de muestras	Título en UA/mL (punto de corte)	Referencia sin bilirrubina	Enriquecidas con 0,3 g/L bilirrubina
19 (negativo)	6,9 (> 2,2)	-	-
43 (positivo débil)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (positivo fuerte)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabla 11

Muestras tituladas usando el método ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
		Referencia sin triglicéridos	Enriquecidas con 30 g/L de triglicéridos
Número de muestras	Título en UA/mL (Punto de corte)		
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (positivo débil)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (positivo fuerte)	5,6 (> 0,8)	+	+

Los resultados muestran que la hemoglobina, la bilirrubina y los triglicéridos no interfieren con el test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM hasta las concentraciones de 5 g/L, 0,3 g/L y 30 g/L respectivamente.

#### Efecto de los ciclos de congelado-descongelado

Las muestras de suero anti-*Borrelia* IgM negativo, positivo débil y positivo fuerte que han pasado 3 ciclos de congelado-descongelado no demostraron ningún efecto en los resultados del test.

#### 14. Referencias

1. Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
2. Lyme Disease and Related Tick-Borne Infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
3. Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352 : 557-565.
4. Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6 : S1487-S1493.
5. Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. Option Bio. 387 : 20-21.
6. La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
7. Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33 : 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 GP

### 1. Scopo del test

Il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM è un test rapido qualitativo di screening per la rilevazione degli IgG ed IgM umani dei ceppi Europei di *Borrelia* in campioni di siero e plasma umani. Il test è concepito come supporto nella diagnosi della malattia di Lyme conosciuta anche come borreliosi di Lyme ed è concepito solo per uso professionale. In caso di risultato positivo, il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM non permette l'individuazione dello stadio della malattia.

### 2. Introduzione e Significato Clinico

La malattia di Lyme (1) oppure borreliosi di Lyme è causata dallo spirocete *Borrelia burgdorferi sensu lato*, trasmessa dalle zecche. Le zecche contagiose, infestate dal *Borrelia burgdorferi sensu lato*, sono presenti principalmente nel Nord America (*Ixodes scapularis* o *Ixodes pacificus*) e nelle aree temperate dell'Europa dell'Ovest (*Ixodes ricinus*). Le specie di zecca europee vettori del ceppo Europeo di *Borrelia*, sono *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2) così come *B. spielmanii* e *B. bavariensis*, conosciute anche per essere patogene. Anche i ceppi *B. valaisiana* e *B. lusitanae* sono considerati ceppi potenzialmente patogeni. Grazie all'elevata somiglianza tra i ceppi *Borrelia*, gli IgG ed IgM diretti contro diverse specie di *Borrelia* producono una reazione incrociata con il cocktail di antigeni del test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, almeno nel caso dei ceppi europei.

Tra il 30% e l'80% dei casi, uno sfogo cutaneo (*erythema chronicum migrans*) è il primo segno clinico dell'infezione, esso compare dopo i 3 e 10 giorni in corrispondenza della puntura della zecca. Entro 1 e 3 mesi dopo, compaiono i primi segni neurologici quali mal di testa o disordini più seri quali mielite (3) anche in assenza di *rythema chronicum migrans*. I pazienti potrebbero anche sviluppare, dopo molto tempo, complicazioni più gravi quali ad esempio attacchi intermittenti di artrite articolare, miocarditi o acrodermatiti.

### 3. Principio del Test

Il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM utilizza una combinazione unica di coniugati immunoglobuline-dye anti umane, *B. burgdorferi* e *B. garinii* nativi altamente purificati così come antigeni ricombinanti *B. burgdorferi*.

Il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM è costituito da un astuccio di plastica contenente due test a striscia interni per l'individuazione di IgG o IgM. Una volta raccolto il campione di plasma oppure siero, vengono aggiunte poche gocce di campione in ogni pozzetto di raccolta del campione (⇒) del test a cassetta.

Quando il campione migra lungo la membrana della striscia (individuazione IgM), i coniugati di immunoglobuline-dye anti umane si legano agli IgM umani formando complessi anticorpo-antigene. Allo stesso modo, il campione migra lungo la membrana della striscia (rilevazione IgG) dove i coniugati di immunoglobuline-dye anti umane si legano agli IgG umani formando complessi anticorpo-antigene. In caso di risultati positivi, questi complessi si legano agli antigeni specifici nella/e regione/i della linea del test nel test a cassetta producendo (a) una linea/e di colore rosa. In assenza di anticorpi anti-*Borrelia*, non compare alcuna linea nella/e regione/i della/e linea/e del test sul test a cassetta. La mistura

di reazione continua a migrare lungo le membrane del test a cassetta. I coniugati non legati si legano ai reagenti in ciascuna regione della linea di controllo, producendo una linea rosa che dimostra che è stato aggiunto il giusto volume di campione e che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente.

### 4. Reagenti e Materiali Forniti

- 10 test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, test a cassetta (pipette monouso di plastica incluse)
- 1 soluzione contenente detergente e <0.1% NaN3 (6 ml)
- 1 istruzioni per l'uso

### 5. Altri materiali richiesti

- Timer

### 6. Conservazione e Stabilità

Tutti i componenti del kit di test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM dovrebbero essere conservati tra +4°C e +30°C. I test vanno conservati nella loro confezione fino all'utilizzo. Non congelare i kit di test. Il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

### 7. Avvertenze e Precauzioni

- Esclusivamente per uso diagnostico professionale *in-vitro*.
- Leggere attentamente la procedura del test prima di eseguirlo.
- Non utilizzare il test oltre la data di scadenza riportata sulla confezione.
- Non utilizzare il test se la confezione dovesse risultare danneggiata.
- Non riutilizzare i test.
- Non utilizzare il test oltre la data di scadenza riportata sulla confezione.
- Al fine di evitare la contaminazione non toccare l'area di risultato (result area).
- Evitare il rischio di contaminazione incrociata utilizzando sempre un nuovo tubo di raccolta per ogni campione ottenuto.
- Non sostituire o mescolare i componenti provenienti da kit differenti.
- Non mangiare, bere o fumare nei luoghi in cui vengono trattati i campioni ed i test.
- Indossare abiti protettivi quali camici da laboratorio, guanti monouso ed occhiali protettivi quando vengono trattati i campioni.
- Considerare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Osservare le normali precauzioni contro rischi microbiologici e seguire le procedure standard per il corretto smaltimento dei campioni.
- Il kit fornito contiene prodotti di origine animale. La conoscenza certificata della provenienza e/o condizione sanitaria degli animali non esclude del tutto l'assenza di agenti patogeni trasmissibili. Si raccomanda, pertanto, che questi prodotti vengano trattati come potenzialmente infettivi ed utilizzati nel rispetto delle normali pratiche di sicurezza (ad esempio, non ingerire o inalare).
- Il diluente contiene azoturo di sodio che potrebbe reagire con piombo oppure impianti idraulici e portare alla formazione di acidi metallici potenzialmente esplosivi. Quando si getta questa soluzione, scaricare sempre con

abbondante acqua per prevenire la formazione di azoturo. Evitare il contatto con gli occhi oppure le membrane mucose. In caso di contatto, lavare meticolosamente le mani.

- Umidità o temperature elevate possono influenzare in maniera negativa i risultati del test.
- I materiali utilizzati nello svolgimento del test vanno smaltiti nel rispetto delle regolamentazioni locali.

### 8. Preparazione e Raccolta del Campione

#### Siero oppure plasma (litio oppure ammonio eparinizzato, EDTA)

I campioni dovrebbero essere raccolti in condizioni standard di laboratorio (ad es. asetticità e in modo da evitare emolisi).

Nel caso in cui il test venga eseguito nelle 48 ore dalla raccolta del campione, i campioni andrebbero conservati in frigorifero a 2-8°C. I campioni vanno invece congelati se il test verrà eseguito dopo più di 48 ore dalla raccolta del campione. Prima di eseguire il test scongelare completamente il campione, mescolare energicamente e portare a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Evitare il congelamento e scongelamento ripetuto dei campioni.

In caso di torbidità, alta viscosità o in presenza di particolati nei campioni di siero, questi dovrebbero essere diluiti con un volume equivalente (V/V) di soluzione di diluizione (non forniti ma disponibili dietro richiesta) prima di eseguire il test.

### 9. Procedura del Test

**Portare il test a cassetta, la soluzione, il campione e/o i controlli a temperatura ambiente (15-30°C) prima di eseguire il test.**

1. Rimuovere il test a cassetta dalla sua confezione. Etichettare il test con il nome del paziente o il numero del controllo.
2. Riempire una pipetta con il campione di siero oppure plasma. Mantenendo la pipetta verticalmente, versare 1 goccia (25 µL) di campione in ogni pozzetto di raccolta del campione (⇒).
3. Aggiungere esattamente 6 gocce (200 µL) di soluzione in ogni pozzetto di raccolta del campione (⇒).
4. Leggere il risultato del test entro 10-15 minuti. Non interpretare i risultati dopo più di 15 minuti.



### 10. Interpretazione dei risultati

#### Positivo IgG:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella regione della linea del test (T) per l'IgG.



#### Positivo IgM:

Compare una linea colorata in corrispondenza di ogni regione della linea di controllo (C) ed una linea colorata si sviluppa nella



regione della linea del test (T) per l'IgM.

#### Positivo per IgG ed IgM:

Oltre alla linea di controllo 'C', compare una linea colorata in ogni regione della linea del test 'T' per IgG ed IgM.



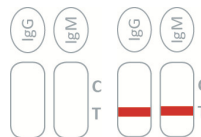
#### Negativo:

Si sviluppa una linea colorata nella regione della linea di controllo (C). Non compare nessuna linea colorata nelle regioni delle linee del test 'T' per 'IgG' e 'IgM'.



#### Non valido:

Le linee di controllo "C" non compaiono. I risultati di qualsiasi test che non abbia prodotto alcuna linea di controllo entro i tempi di lettura indicati, non vanno presi in considerazione.



Un volume insufficiente di campione, procedure operative scorrette o test scaduti sono tra le principali cause che potrebbero impedire la comparsa della linea di controllo. In tal caso si consiglia di rivedere la procedura e ripetere il test utilizzando un nuovo test a cassetta. Se il problema persiste, si consiglia di interrompere immediatamente l'utilizzo dello stesso lotto di test e contattare il proprio distributore.

### 11. Controllo Qualità

#### Controllo interno:

La linea colorata che compare in corrispondenza della regione della linea di controllo (C) è da considerarsi un controllo procedurale interno. Ciò conferma che è stato aggiunto il giusto volume di campione, che la migrazione lungo la membrana è avvenuta correttamente e che sono state applicate le corrette tecniche procedurali.

#### Controllo esterno:

È consigliabile utilizzare un controllo positivo e negativo esterno per assicurare la giusta performance del test.

### 12. Limiti del Test

- Il risultato ottenuto con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM non va utilizzato come unico criterio per la diagnosi della borreliosi di Lyme.
- La risposta immunitaria può arrivare tardi nei pazienti infetti. Durante il primo stadio (I) della malattia (6), caratterizzato dalla comparsa dell'*erythema migrans*, gli IgM potrebbero essere individuati solo 2 o 6 settimane dopo la puntura della zecca e addirittura solo nel 40-60% dei casi. Durante il secondo stadio (II) che corrisponde allo sviluppo della neuroborreliosi acuta, gli IgM ed IgG vengono individuati nel 70-90% dei casi. Pertanto, se la prima volta si ottiene un risultato negativo, si raccomanda di eseguire un altro test 4-6 settimane dopo per controllare il livello degli anticorpi. Durante il terzo stadio (III), che è caratterizzato da acrodermatite cronica atrofica ed artrite di Lyme, gli IgM ed IgG sono generalmente individuabili.
- Alcuni fattori quali uno stadio della malattia molto prematuro oppure un precedente trattamento del paziente

con antibiotici potrebbero portare a falsi risultati negativi. Questo è dovuto alla bassa concentrazione di IgM anti-*Borrelia* che il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM non è in grado di individuare.

- In alcuni casi, un risultato positivo del test potrebbe verificarsi a causa della resistenza di IgG o IgM per più di 10 anni dopo il trattamento (7). A causa della presenza osservata di reazioni incrociate (vedere tabella 2 per IgG e tabella 8 per IgM, paragrafo "Reazioni incrociate e specificità analitica"), con anticorpi anti-CMV per IgM, è importante essere cauti nell'interpretazione finale del risultato del test ottenuto con il NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- I livelli di anticorpo possono variare in base al paziente. La prevalenza di anticorpi generalmente è vicino al 3-5% mentre nei soggetti esposti (forestali, escursionisti) gli anticorpi possono essere rilevati nel 25-30% dei casi (5).
- Come per qualsiasi procedura diagnostica, i dati ottenuti con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM andrebbero interpretati in congiunzione con altre informazioni cliniche in quanto i pazienti affetti da borreliosi potrebbero mostrare sintomi simili a quelli della sifilide (4).
- Il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM dovrebbe essere utilizzato in congiunzione con tutti i criteri quali ad esempio lo storico della situazione epidemiologica della regione, i sintomi del paziente ed i limiti del test.

### 13. Caratteristiche Tecniche

#### IgG Lyme

##### Sensibilità e Specificità diagnostica:

141 campioni di siero provenienti da differenti panel di origine Europea precedentemente analizzati con il metodo EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin and Enzygnost Dade-Behring) sono stati analizzati utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 1

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Metodo di riferimento (EIA)		
	+	-	Totale
	+	61	11
-	14	55	69
Totale	75	66	141

Le prestazioni sono calcolate in base ai dati presentati nella tabella seguente:

Sensibilità:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Specificità:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Andamento complessivo:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Specificità analitica

I campioni di siero contenenti livelli alti di anticorpi anti-Treponema pallidum, Fattori Reumatoidi, anti-EBV, anti-CMV oppure anticorpi antinucleari sono stati analizzati utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM per valutare possibili interferenze. I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 2

Campioni positivi	Risultati positivi ottenuti con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Numero totale di campioni
Sifilide	0	44
Fattore reumatoide	2	30
anticorpi anti-EBV	0	30
anticorpi anti-CMV	0	30
anticorpi antinucleari	1	30
Numero totale di campioni	3	164

I risultati mostrano che potrebbero verificarsi reazioni incrociate con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM se i campioni contengono livelli elevati di fattori reumatoidi oppure anticorpi antinucleari. In ogni caso, la specificità analitica generale ottenuta quando si analizzano questi campioni potenzialmente interferenti, rimane al 98,2% (161/164).

##### Interferenze

I campioni di siero analizzati con il metodo ELISA (Virotech) sono stati adulterati con emoglobina umana (2,5 g/L), bilirubina (0,3 g/L) oppure trigliceridi (10 g/L). Utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM questi campioni sono stati analizzati anche senza essere adulterati.

I risultati sono riassunti rispettivamente nelle seguenti tabelle:

Tabella 3

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-off)	Referenza senza emoglobina	Adulterati con 2,5 g/L di emoglobina
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (basso positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (alto positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Tabella 4

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-off)	Referenza senza bilirubina	Adulterati con 0,3 g/L di bilirubina
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (basso positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (alto positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Tabella 5

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-Off)	Referenza senza trigliceridi	Adulterati con 10 g/L di trigliceridi
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (basso positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (alto positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Questi risultati mostrano che emoglobina, bilirubina e trigliceridi non interferiscono con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM alle concentrazioni di 2,5 g/L, 0,3 g/L e 10 g/L rispettivamente.

### Lyme IgM

#### Sensibilità e Specificità diagnostica:

251 campioni di siero provenienti da differenti panel di origine Europea precedentemente analizzati con il metodo EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin and Enzygnost Dade-Behring) sono stati analizzati utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 6

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Metodo di riferimento (EIA)		
	+	-	Totale
	+	139	16
-	14	82	96
Totale	153	98	251

Le prestazioni sono calcolate in base ai dati presentati nella tabella seguente:

Sensibilità:  $139+153/(75+66) \times 100 = 82\%$

Specificità:  $82+98/(84+66) \times 100 = 82\%$

Andamento complessivo:  $(139+82)/(98+100) \times 153 = 88\%$

#### Sensibilità diagnostica nei 3 stadi clinici della malattia di Lyme

È stato condotto uno studio in un laboratorio Europeo di riferimenti per la *Borreliosis* utilizzando campioni di siero corrispondenti ai differenti stadi clinici della malattia di Lyme: stadio I caratterizzato da *erythema chronicum migrans* (EM); stadio II corrispondente allo sviluppo di neuroborreliosis acuta (NB) e stadio III caratterizzato da acrodermatite atrofica cronica (ACA) e dall'artrite di Lyme (LA).

I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 7

Stadio	Numero di campioni	Numero di campioni positivi		Sensibilità in %
		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	ELISA DIASORIN (cut-off: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Tra i campioni analizzati, 4 allo stadio I, 5 allo stadio II e 7 allo stadio III hanno mostrato un risultato IgM molto basso positivo (titolo al di sotto di 1,5 x valore di cut-off).

#### Reazioni incrociate e specificità analitica

I campioni di siero contenenti livelli alti di anticorpi anti-*Treponema pallidum*, fattori reumatoidi, anti-EBV, anti-CMV oppure anticorpi antinucleari sono stati analizzati utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM per valutare possibili interferenze. I risultati sono riassunti nella seguente tabella:

Tabella 8

Campioni positivi	Risultati positivi ottenuti con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Numero totale di campioni
Sifilide	6	53
Fattori Reumatoidi	1	30
anticorpi anti-EBV	3	30
anticorpi anti-CMV	9	30
anticorpi antinucleari	4	30
Numero totale di campioni	23	173

I risultati mostrano che possono verificarsi episodi di reattività incrociata con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM se i campioni contengono livelli elevati di fattori reumatoidi, anticorpi anti-*Treponema pallidum* oppure anticorpi antinucleari. In ogni caso, la specificità analitica generale ottenuta quando si analizzano questi campioni potenzialmente interferenti, rimane all'86,7% (150/173).

#### Interferenze

I campioni di siero analizzati utilizzando differenti metodi ELISA (Diasorin, Euroimmun) sono stati adulterati con emoglobina umana (5 g/L), bilirubina (0,3 g/L) oppure trigliceridi (30 g/L). Utilizzando il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM questi campioni sono stati analizzati anche senza essere adulterati.

I risultati sono riassunti rispettivamente nelle seguenti tabelle:

Tabella 9

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-Off)	Referenza senza emoglobina	Adulterato con 5 g/L di emoglobina
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (basso positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (alto positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+



Tabella 10

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-off)	Referenza senza bilirubina	Adulterato con 0,3 g/L di bilirubina
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (basso positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (alto positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabella 11

Campioni titolati con il metodo ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Numero di campioni	Titolo in UA/mL (Cut-Off)	Referenza senza trigliceridi	Adulterato con 30 g/L di trigliceridi
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (basso positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (alto positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+

Questi risultati mostrano che emoglobina, bilirubina e trigliceridi non interferiscono con il test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM alle concentrazioni di 5 g/L, 0,3 g/L e 30 g/L rispettivamente.

#### Effetto dei cicli di congelamento e scongelamento

Campioni di siero IgM anti-*Borrelia* negativi, bassi positivi e fortemente positivi che abbiano subito 3 cicli di congelamento e scongelamento non mostrano alcun effetto sul risultato del test.

#### 14. Bibliografia

- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-borne Infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352: 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6: S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. Option Bio. 387: 20-21.
- La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
- Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33: 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 BN

### 1. Zastosowanie

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM jest szybkim, jakościowym testem przesiewowym do wykrywania ludzkich IgG i IgM przeciwko europejskim szczepom *Borrelia* w ludzkiej surowicy i osoczu. Badanie ma na celu pomóc w rozpoznaniu choroby z Lyme (znanej również jako borelioza z Lyme) i przeznaczone jest wyłącznie do profesjonalnego użytku. Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM nie pozwala jednak na określenie stadium choroby przy wyniku pozytywnym.

### 2. Wprowadzenie i znaczenie diagnostyczne

Borelioza Lyme (1) lub choroba Lyme wywoływana jest przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato*, które przenoszone są przez kleszcze. Kleszcze, które zainfekowane są *Borrelia burgdorferi sensu lato*, głównie spotykane są w Północnej Ameryce (*Ixodes scapularis* lub *Ixodes pacificus*) oraz obszarach umiarkowanych Europy Zachodniej (*Ixodes ricinus*). Europejskie gatunki kleszczy są nosicielami europejskich szczepów *Borrelia*, takich jak: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2), *B. spielmanii* i *B. bavariensis*, które są również znane jako patogeny. *B. valaisiana* i *B. lusitanae* są również uważane za potencjalnie patogenne. Ze względu na wysokie podobieństwo szczepów *Borrelia* IgG i IgM, które są skierowane przeciwko różnym gatunkom *Borrelia*, reagują one krzyżowo z testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, w każdym razie w szczepach europejskich.

W 30% do 80% przypadków rumień (*Erythema chronicum migrans*) jest pierwszym klinicznym znakiem infekcji i pojawia się po 3 do 10 dniach w miejscu ugryzienia. Od 1 do 3 miesięcy później pojawiają się pierwsze neurologiczne objawy, jak np. bóle głowy lub silne zaburzenia jak zapalenie rdzenia kręgowego nawet przy niewystępowaniu *Erythema chronicum migrans*. U pacjentów mogą rozwinąć się ciężkie komplikacje, jak np. sporadyczne napady zapalenia stawów nawet dużo później, wiele lat po infekcji pierwotnej - zapalenie mięśnia sercowego lub Zespołu Brandta.

### 3. Zasada działania testu

Unikalna kombinacja anty-ludzkiej immunoglobuliny koniugatów barwnika i wysoce oczyszczonej macierzystej *B. burgdorferi* i *B. garinii*, jak również zrekombinowanych antygenów *B. burgdorferi* na fazie stałej stosowana jest w teście NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, w celu wykrywania swoistych przeciwciał przeciw *Borrelia*.

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM składa się z plastikowej obudowy zawierającej dwa wewnętrzne paski testowe do wykrywania IgG lub IgM. Po pobraniu próbki osocza lub surowicy, należy dodać kilka kropli próbki do każdego zagłębienia próbki (⇒) na kasiecie testowej. W momencie, gdy próbka do oznaczania IgM wędruje wzdłuż membrany, anty-ludzka immunoglobulina koniugatów barwnika wiąże się z ludzkimi IgM, przy czym powstają kompleksy przeciwciało-antygen. W ten sam sposób próbka wędruje dla oznaczania IgG wzdłuż membrany, gdzie anty-ludzka immunoglobulina koniugatów barwnika wiąże się z ludzkimi IgG, przy czym powstają kompleksy przeciwciało-antygen. W przypadkach wyników pozytywnych kompleksy te wiążą się ze specyficznymi antygenami w obszarze linii testowej na kasiecie testowej i wywołują różową linię. Przy braku przeciwciał przeciw *Borrelia* nie pojawiają się linie w obszarze linii testowej

na kasiecie testowej. Mieszanina reakcyjna wędruje dalej wzdłuż membrany. Niezwiązane koniugaty wiążą się z odczynnikami w każdym obszarze linii kontrolnej, przy czym każdorazowo powstaje różowa linia, która wskazuje, że dodana została wystarczająca ilość próbki i że membrana jest wystarczająco nasączona.

### 4. Materiały zawarte w zestawie

- 10 testów kasetowych NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (wraz z pipetami z tworzywa sztucznego)
- 1 bufor "Buffer" (6 ml), zawierający detergent oraz <0,1% NaN<sub>3</sub>
- 1 instrukcja obsługi

### 5. Dodatkowo potrzebne materiały

- Stoper

### 6. Data ważności i przechowywanie odczynników

Wszystkie elementy składowe zestawu testowego NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM powinny być przechowywane w temperaturze pomiędzy +4°C a +30°C. Kasetka testowa musi zostać w zamkniętym opakowaniu foliowym aż do momentu jej użycia. Nie zamrażać zestawów testowych. Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM jest stabilny do daty ważności podanej na opakowaniu.

### 7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Tylko do profesjonalnej diagnostyki *in-vitro*.
- Przed przeprowadzeniem testu należy dokładnie przeczytać całą instrukcję obsługi.
- Nie używać testu po upływie daty użyteczności podanej na opakowaniu.
- Nie używać testu, jeżeli opakowanie foliowe jest uszkodzone.
- Nie używać ponownie tych samych testów.
- Nie pipetować próbek na pole reakcyjne (pole wyniku).
- Aby uniknąć zanieczyszczenia, nie należy dotykać pola reakcyjnego (pola wyniku).
- W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego należy używać każdorazowo nowej probówki dla każdej próbki.
- Nie wymieniać lub mieszać elementów składowych z różnych zestawów testowych.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić w obszarze pracy z próbkami lub zestawem testowym.
- Podczas kontaktu z próbkami, stosować odzież ochronną, taką jak fartuch, jednorazowe rękawiczki oraz okulary ochronne.
- Traktować wszystkie próbki tak, jakby zawierały zakaźne odczynniki. Należy zwrócić uwagę na zaistniałe środki ostrożności dla mikrobiologicznego ryzyka, podczas wszystkich procesów jak również standardowych dyrektyw dla odpowiedniej utylizacji próbek.
- Test ten zawiera produkty pochodzenia zwierzęcego. Certyfikowana wiedza o pochodzeniu i/lub o stanie sanitarnym zwierząt nie gwarantuje braku przenoszonych patogenów. Dlatego zaleca się, aby te produkty były traktowane, jako potencjalnie zakaźne. Posługując się nimi, należy przestrzegać standardowych środków ostrożności (np. unikać połknięcia lub wdychania).
- Roztwór buforowy zawiera azcydek sodu, który w połączeniu z ołowiem lub miedzianymi rurami kanalizacyjnymi może

spowodować powstanie potencjalnie wybuchowych azydów metali. Używając roztwór buforowy, przepłukać go dużą ilością wody, aby zapobiec nadmiernemu gromadzeniu się azydów. Unikaj kontaktu z oczami i błonami śluzowymi. Podczas przypadkowego kontaktu, dokładnie przemyć dużą ilością wody.

- Wilgoć oraz wysokie temperatury mogą mieć wpływ na wyniki testu.
- Zużyte materiały testowe powinny być zutylizowane zgodnie z lokalnymi zaleceniami.

### 8. Pobieranie, przygotowywanie i przechowywanie próbek

#### Surowica lub osocze (heparyna litowa lub amonowa, EDTA)

Próbki powinny być pobierane w warunkach laboratoryjnych (aseptycznie i unikając hemolizy).

Próbki powinny być przechowywane w temperaturze 2-8°C, jeżeli test ma być przeprowadzony w ciągu 48 godzin po pobraniu próbki.

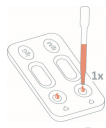
Jeśli test przeprowadzony jest po upływie więcej niż 48 godzin po pobraniu próbki, próbki powinny zostać zamrożone. Zamrożone próbki muszą zostać całkowicie rozmrożone, dokładnie wymieszane oraz doprowadzone do temperatury pokojowej. Unikaj ponownych cykli zamrażania oraz rozmrażania.

W przypadku zmętnienia, wysokiej lepkości lub obecności cząstek w próbkach surowicy, przed badaniem należy rozcieńczyć próbkę taką samą objętością (V/V) bufora rozcieńczającego (nie zawarty w zestawie, ale dostępny na zapytanie).

### 9. Przeprowadzanie testu

**Doprowadzić kasetę testową, bufor, próbkę oraz/albo kontrolę przed przeprowadzeniem testu do temperatury pokojowej (15-30°C).**

1. Wyciągnąć kasetę testową z zamkniętego opakowania foliowego i użyć ją możliwie jak najszybciej. Oznaczyć kasetę testową nazwiskiem pacjenta i numerem kontrolnym.
2. Napełnić jednorazową pipetę próbką surowicy lub osocza. Trzymać pipetę pionowo i dodać 1 kroplę (25 µL) próbki do każdego zagłębienia na próbce (→).
3. Dodać dokładnie 6 kropli (200 µL) buforu do każdego zagłębienia na próbce (→).
4. Wynik należy interpretować po upływie 10 do 15 minut. Po upływie więcej jak 15 minut nie interpretować wyników.

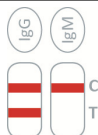


10-15 min

### 10. Interpretacja wyników

#### Pozytywny dla IgG:

Kolorowa linia pojawia się w obszarze linii kontrolnej „C” i kolorowa linia pojawia się w obszarze linii testowej „T” dla IgG.



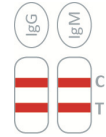
#### Pozytywny dla IgM:

Kolorowa linia pojawi się w obszarze linii kontrolnej „C” i kolorowa linia pojawi się w obszarze linii testowej „T” dla IgM.



#### Pozytywny dla IgG i IgM:

Dodatkowo do linii kontrolnych (C) pojawia się każdorazowo kolorowa linia w obszarze linii testowych (T) dla IgG i IgM.



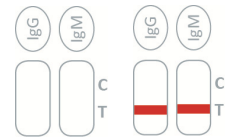
#### Negatywny:

Pojawi się jedynie tylko jedna kolorowa linia w każdym obszarze linii kontrolnej „C”. Nie pojawią się kolorowe linie w obszarze linii testowej „T” dla IgG i IgM.



#### Nieważny:

Linie kontrolne (C) nie pojawiają się. Wyniki testów, które po ustalonym czasie odczytu nie wytworzyły linii kontrolnej, muszą zostać odrzucone.



Niewystarczająca objętość próbki, przeterminowane testy lub niewłaściwy sposób użytkowania testu, są najprawdopodobniej przyczynami niepojawienia się linii kontrolnej. Należy sprawdzić przebieg procesu i powtórzyć badanie przy pomocy nowej kasety testowej. Jeżeli problem będzie występował nadal, nie używać już tego zestawu testowego i skontaktować się z dystrybutorem.

### 11. Kontrola jakości

#### Wewnętrzna kontrola:

pojawiająca się w obszarze linii kontrolnej (C) kolorowa linia, traktowana jest jako kontrola procesowa. Potwierdza ona dodanie wystarczającej ilości próbki, prawidłowe przeprowadzenie testu oraz wystarczające nasączenie membrany.

#### Zewnętrzna kontrola:

Zaleca się zastosowanie zewnętrznych kontroli pozytywnych i negatywnych do oznaczania właściwej wydajności testów.

### 12. Ograniczenia testu

- Wynik uzyskany w teście NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM nie powinien być stosowany jako wyłączne kryterium rozpoznania choroby z Lyme.
- Reakcja immunologiczna może być opóźniona u zakażonych pacjentów. Podczas początkowej fazy (I) choroby (6), która charakteryzuje się rozwojem rumienia wędrującego, IgM można wykryć dopiero 2 do 6 tygodni po ukąszeniu kleszcza i tylko w 40 do 60% przypadków. Podczas drugiego etapu (II), który odpowiada rozwojowi ostrej neuroborreliozy, IgM i IgG są wykrywane w 70 do 90% przypadków. Dlatego, jeśli wynik negatywny został uzyskany po raz pierwszy, zaleca się wykonanie kolejnego testu 4 do 6 tygodni później w celu sprawdzenia poziomu przeciwciał. Podczas trzeciego etapu choroby (III), która charakteryzuje się przewlekłym

zanikowym zapaleniem skóry i boreliozą, przeciwciała IgM i IgG są zwykle wykrywalne.

- Niektóre czynniki, takie jak np. bardzo wczesne etapy infekcji lub wcześniejsze leczenie pacjenta antybiotykami, mogą spowodować wyniki fałszywie ujemne z powodu niskiego stężenia anty-borrelii IgM, których nie można wykryć za pomocą testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- W niektórych przypadkach wynik dodatni z powodu trwałości IgG lub IgM można uzyskać przez ponad 10 lat po leczeniu (7). Ze względu na obserwowane reakcje krzyżowe (patrz tabela 2 dla IgG i tabela 8 dla IgM w rozdziale "Reakcje krzyżowe i specyficzność analityczna"), takie jak np. przy przeciwciałach przeciwko CMV przeciwko IgM, ważne jest, aby dokładnie zinterpretować końcową ocenę wyniku testu uzyskanego przy pomocy testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- Stężenia przeciwciał mogą być zmienne i zależne od pacjentów. Częstość występowania przeciwciał w populacji całkowitej jest bliska od 3% do 5%, podczas gdy przeciwciała występują u osób, które bardziej narażone są na borelie (leśnicy, piechurzy), mogą zostać wykryte w 25% do 30% przypadków (5).
- Podobnie jak w przypadku wszystkich procedur diagnostycznych, lekarz powinien porównać dane uzyskane przy pomocy testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM z innymi klinicznymi informacjami, ponieważ pacjenci cierpiący na boreliozę mają objawy podobne do objawów kłdy (4).
- Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM powinien być stosowany z uwzględnieniem wszystkich kryteriów, takich jak historyczna sytuacja epidemiologiczna w regionie, objawy pacjenta i ograniczenia testu.

### 13. Charakterystyka testu

#### IgG Lyme

##### Czułość i swoistość diagnostyczna:

141 próbek surowicy z różnych paneli pochodzenia europejskiego, wstępnie przetestowanych metodą EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin i Enzygnost Dade-Behring), zbadano za pomocą NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

Tabela 1

NADAL® Lyme Borreliosis Test IgG/IgM (IgG)	Metoda referencyjna (EIA)		
	+	-	Suma
	+	61	11
-	14	55	69
Suma	75	66	141

Wydajność oblicza się na podstawie danych pokazanych w powyższej tabeli w następujący sposób:

Czułość:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Swoistość:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Ogólna zgodność:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Reakcje krzyżowe oraz swoistość analityczna

Próbki surowicy zawierające wysokie poziomy przeciwciał przeciw Treponema pallidum, czynników reumatoidalnych, przeciwciała przeciwko EBV, przeciwciała przeciwko CMV lub

przeciwciała przeciwjadrowe, testowano testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM w celu oceny potencjalnych zakłóceń. Wyniki przedstawione zostały w poniższej tabeli:

Tabela 2

Pozytywne próbki	Wyniki pozytywne osiągnięte przy pomocy testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM	Całkowita ilość próbek
Syfilis	0	44
Czynniki reumatoidalne	2	30
Przeciwciała przeciw EBV	0	30
Przeciwciała przeciw CMV	0	30
Przeciwciała antynuklearne	1	30
Całkowita ilość próbek	3	164

Wyniki wskazują, że reakcje krzyżowe z testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM mogą wystąpić, jeśli próbki zawierają wysokie poziomy czynnika reumatoidalnego lub przeciwciał przeciwjadrowych. Jednak ogólna analityczna specyficzność uzyskana podczas testowania tych potencjalnie zakłócających próbek nadal wynosi 98,2% (161/164).

##### Interferencje

Próbki surowicy testowane metodą ELISA (Virotech) zostały wzbogacone o ludzką hemoglobinę (2,5 g/L), bilirubinę (0,3 g/L) lub triglicerydy (10 g/L). Próbkę te również testowano równoległe bez dodawania substancji za pomocą testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Wyniki przedstawiono w poniższych tabelach:

Tabela 3

Miareczkowane próbki metodą ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez hemoglobiny	Z dodaną hemoglobiną 2,5 g/L
98 (negatywny)	5,8 (> 9)	-	-
62 (słabo pozytywny)	20,4 (> 9)	+	+
91 (mocno pozytywny)	47,5 (> 9)	+	+

Tabela 4

Miareczkowane próbki metodą ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez bilirubiny	z dodaną 0,3 g/L bilirubiną
98 (negatywny)	5,8 (> 9)	-	-
62 (słabo pozytywny)	20,4 (> 9)	+	+
91 (mocno pozytywny)	47,5 (> 9)	+	+

Tabela 5

Miareczkowane próbki metodą ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez trójglicerydów	Z dodanymi triglicerydami 10 g/L
98 (negatywny)	5,8 (> 9)	–	–
62 (słabo pozytywny)	20,4 (> 9)	+	+
91 (mocno pozytywny)	47,5 (> 9)	+	+

Wyniki pokazują, że hemoglobina, bilirubina i trójglicerydy nie zakłócają testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM do stężenia 2,5 g / L, 0,3 g / L i 10 g / L.

### Lyme-IgM

#### Czułość i swoistość diagnostyczna

251 próbek surowicy z różnych paneli pochodzenia europejskiego, wstępnie przetestowanych metodą EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin i Enzygnost Dade-Behring), zbadano za pomocą NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Wyniki przedstawione zostały w poniższej tabeli:

Tabela 6

NADAL® Lyme Borreliosis Test IgG/IgM (IgM)	Metoda referencyjna (EIA)		
	+	–	Suma
+	139	16	155
–	14	82	96
Suma	153	98	251

Wydajność oblicza się na podstawie danych pokazanych w powyższej tabeli w następujący sposób:

Czułość:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Swoistość:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Ogólna zgodność:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

#### Czułość diagnostyczna w 3 klinicznych etapach boreliozy z Lyme

W europejskim laboratorium referencyjnym dotyczącym choroby z Lyme przeprowadzono badanie z użyciem próbek surowicy odpowiadających różnym stadiom klinicznym choroby z Lyme: Stadium I, charakteryzujące się rumieniem chronicznym migransem (EM); Stadium II odpowiadające rozwojowi ostrej neuroboreliozy (NB) i stadium III, które charakteryzuje się przewlekłym atroficznym zapaleniem skóry (ACA) i boreliozowym zapaleniem stawów (LA).

Wyniki przedstawione zostały w poniższej tabeli:

Tabela 7

Stadium	Ilość próbek	Ilość pozytywnych próbek		Czułość w %
		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	DIASORIN ELISA (Cut-Off: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Wśród badanych próbek znajdowały się 4 próbki z I Etapu, 5 próbek II Etapu i 7 próbek z III Etapu o bardzo niskim IgM dodatnim (miana mniejsze niż 1,5 x wartości odcięcia).

#### Reakcje krzyżowe oraz swoistość analityczna

Próbki surowicy zawierające wysokie poziomy przeciwciał przeciw Treponema pallidum, czynników reumatoidalnych, przeciwciał przeciwko EBV, przeciwciał przeciwko CMV lub przeciwciała przeciwjadrowe testowano testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM w celu oceny potencjalnych zakłóceń. Wyniki przedstawione zostały w poniższej tabeli:

Tabela 8

Próbki pozytywne	Dodatnie wyniki uzyskane za pomocą testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM	Całkowita ilość próbek
Syfilis	6	53
Czynniki reumatoidalne	1	30
Przeciwciała przeciw EBV	3	30
Przeciwciała przeciw CMV	9	30
Przeciwciała antynuklearne	4	30
Całkowita ilość próbek	23	173

Wyniki wskazują, że reakcje krzyżowe z testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM mogą wystąpić, jeśli próbki zawierają wysokie poziomy czynnika reumatoidalnego, przeciwciała przeciwko Treponema pallidum lub przeciwciała przeciwjadrowe. Jednak ogólna analityczna specyficzność uzyskana podczas testowania tych potencjalnie zakłócających próbek nadal wynosi 86,7% (150/173).

#### Interferencje

Próbki surowicy badane za pomocą testu ELISA (diasoriny, Euroimmun) zostały wzbogacone o ludzką hemoglobinę (5 g/L), bilirubinę (0,3 g/L) lub trójglicerydy (30 g/L). Próbki te również testowano równolegle bez dodawania substancji za pomocą testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Wyniki przedstawiono w poniższych tabelach:

Tabela 9

Miarczkowane próbki metodą ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez hemoglobiny	Z dodaną hemoglobiną 5 g/L
19 (negatywny)	6,9 (> 22)	-	-
43 (słabo pozytywny)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (mocno pozytywny)	5,6 (> 0,8)	+	+

7. Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to Borrelia burgdorferi 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33 : 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 OM

Tabela 10

Miarczkowane próbki metodą ELISA		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez bilirubiny	Z dodaną 0,3 g/L bilirubiną
19 (negatywny)	6,9 (> 22)	-	-
43 (słabo pozytywny)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (mocno pozytywny)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabela 11

Miarczkowane próbki metodą ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Ilość próbek	Miano w UA/mL (Cut-Off)	Referencje bez trójglicerydów	Z dodanymi trójglicerydami 30 g/L
19 (negatywny)	6,9 (> 22)	-	-
43 (słabo pozytywny)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (mocno pozytywny)	5,6 (> 0,8)	+	+

Wyniki pokazują, że hemoglobina, bilirubina i trójglicerydy nie zakłócają testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM do stężenia 5 g/L, 0,3 g/L i 30 g/L.

#### Wpływ cykli zamrażania i rozmrażania

Próbki surowicy ujemnej, niskiej dodatniej i wysokiej dodatniej surowicy anty-Borrelia IgM, które przeszły 3 cykle zamrażania i rozmrażania, nie miały wpływu na wyniki testu.

#### 14. Bibliografia

- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with Borrelia burgdorferi. Clinical and Diagnostics Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-Borne Infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352 : 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6 : S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. Option Bio. 387 : 20-21.
- La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.

### 1. Uso previsto

O teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM é um teste rápido de triagem qualitativa para a detecção de IgG e IgM humano em estirpes europeias de *Borrelia* em soro e plasma humano. O teste destina-se a ser utilizado como auxílio no diagnóstico da doença de Lyme, também conhecida como borreliose de Lyme, e é concebido apenas para uso profissional. No entanto, no caso de um resultado positivo, o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM não permite determinar o estágio da doença.

### 2. Introdução e significado clínico

A doença de Lyme (1) ou Lyme borreliosis é causada pelo espiroqueta *Borrelia burgdorferi sensu lato*, que é transmitida por carrapatos. Os carrapatos contagiosos, infectados por *Borrelia burgdorferi sensu lato*, são encontrados principalmente na América do Norte (*Ixodes scapularis* ou *Ixodes pacificus*) e em áreas temperadas da Europa Ocidental (*Ixodes ricinus*). As espécies de carraças europeias são vetores de estirpes de *Borrelia* europeias, como *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2) bem como *B. spielmanii* e *B. bavariensis*, que também são conhecidos como patogénicos. carrapato *B. valaisiana* e *B. lusitaniae* também são consideradas como estirpes potencialmente patogénicas. Devido à alta semelhança entre as estirpes de *Borrelia*, a IgG e a IgM dirigidas contra diferentes espécies de *Borrelia* reagem de forma cruzada com o cocktail de antígeno do teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM - pelo menos no caso de estirpes europeias.

Em 30% a 80% dos casos, uma erupção cutânea (*erythema chronicum migrans*) é o primeiro sinal clínico da infecção, aparecendo após 3 a 10 dias no local da picada do carrapato. Entre 1 e 3 meses depois, os primeiros sinais neurológicos, como dor de cabeça ou distúrbios graves como mielite (3), aparecem - mesmo na ausência de *erythema chronicum migrans*. Os pacientes também podem desenvolver complicações graves, como ataques intermitentes de artrite articular, miocardite ou acrodermatite muito mais tarde, mesmo vários anos após a infecção primária.

### 3. Princípio do teste

Uma combinação única de conjugados de imunoglobulinas-corantes anti-humanas e *B. burgdorferi* nativo e *B. garinii* altamente purificados, bem como antígenos recombinantes de *B. burgdorferi* na fase sólida são utilizados no teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM para detectar especificamente anticorpos anti-*Borrelia*.

O teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM compreende uma caixa de plástico contendo duas tiras de teste internas para a detecção de IgG ou IgM. Após a recolha de uma amostra de plasma ou soro, algumas gotas da amostra são adicionadas a cada poço de amostra (⇒) da cassete de teste.

À medida que a amostra migra através da membrana da tira (detecção de IgM), os conjugados imunoglobulinas-corante anti-humano ligam-se a IgM humana, formando complexos anticorpo-antígeno. Do mesmo modo, a amostra flui ao longo da membrana da tira (detecção de IgG), onde os conjugados imunoglobulinas-corantes anti-humano ligam-se a IgG humana, formando complexos anticorpo-antígeno. No caso de resultados positivos, esses complexos ligam-se aos

antígenos específicos na(s) região(ões) da linha de teste da cassete de teste e produzem (uma) linha(s) cor-de-rosa. Na ausência de anticorpos anti-*Borrelia*, não aparece nenhuma linha nas regiões da linha de teste da cassete de teste. A mistura de reacção continua a migrar ao longo das membranas da cassete de teste. Os conjugados não ligados ligam-se aos reagentes em cada região da linha de controlo, produzindo uma linha cor-de-rosa, o que demonstra que o volume apropriado da amostra foi adicionado e ocorreu a absorção da membrana.

### 4. Reagentes e materiais fornecidos

- 10 NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM testes cassete (incl. pipetas de plástico descartáveis)
- 1 solução tampão com detergente e <0.1% Na<sub>3</sub> (6 ml)
- 1 folheto informativo

### 5. Materiais adicionais necessários

- Cronómetro

### 6. Armazenamento e estabilidade

Todos os componentes do kit de teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM devem ser armazenados entre +4°C e +30°C. O teste cassete deve permanecer na embalagem selada até à sua utilização. Não congelar o kit de teste. O teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM é estável até à data de validade indicada na embalagem.

### 7. Avisos e precauções

- Apenas para utilização profissional de diagnóstico *in-vitro*.
- Ler atentamente o procedimento de teste antes de realizar o teste.
- Não utilizar o teste após expirada a data de validade indicada na embalagem.
- Não utilizar o teste caso a embalagem se encontre danificada.
- Não reutilizar os testes.
- Não adicionar amostras à área de reacção (área de resultados).
- De modo a evitar uma contaminação, não tocar na área de reacção (área de resultados).
- Evitar contaminação cruzada utilizando um tubo de recolha de amostra novo para cada amostra obtida.
- Não substituir ou misturar componentes de diferentes kits de teste.
- Não comer, beber ou fumar na área de manuseamento de amostras e kits de testes.
- Utilizar vestuário de protecção como batas, luvas descartáveis e protecção ocular durante o manuseamento das amostras.
- Manusear todas as amostras como potenciais agentes infecciosos. Observar as regulamentações estabelecidas respeitantes a riscos microbiológicos durante todos os procedimentos, e respeitar as directrizes padrão para a eliminação apropriada das amostras.
- O kit de teste contém produtos de origem animal. O certificado de origem e/ou estado sanitário dos animais não garante completamente a ausência de agentes patogénicos transmissíveis. Portanto, é recomendado que todos estes produtos sejam tratados como potencialmente infecciosos e

manuseados de acordo com as precauções de segurança habituais (e.g., não ingerir ou inalar).

- O diluente contém azida de sódio, que poderá reagir com chumbo ou canalização de cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Ao descartar esta solução, lave sempre com uma quantidade abundante de água para evitar a acumulação de azida. Evitar contacto com olhos ou membranas mucosas. Em caso de contacto acidental, lavar bem com água.
- Humidade e temperatura podem afectar adversamente os resultados do teste.
- Materiais de testes usados devem ser descartados de acordo com as regulamentações locais.

## 8. Recolha e preparação de amostras

### Soro ou plasma (lítio ou heparinato de amónio, EDTA)

As amostras devem ser recolhidas em condições laboratoriais padrão (i.e., assepticamente e de maneira a evitar hemólise).

Se o teste for executado dentro de 48 horas após a colheita da amostra, as amostras devem ser armazenadas no frigorífico a 2-8°C. As amostras devem ser mantidas congeladas se o teste for realizado após mais de 48 horas após colheita da amostra. Amostras congeladas devem ser completamente descongeladas, misturando cuidadosamente até atingir a temperatura ambiente antes da realização do teste. Evitar ciclos de des(congelamento) repetidos.

No caso de turvação, elevada viscosidade ou a presença de partículas em suspensão em amostras de soro, deverão estes ser diluídos com igual volume (V/V) de solução tampão (não fornecido mas disponível mediante encomenda) antes de realizar o teste.

## 9. Procedimento do teste

**Permitir que os testes, amostras, solução tampão e/ou controlos atinjam a temperatura ambiente (15-30°C) antes da sua utilização.**

1. Remover o teste cassete da embalagem. Rotular com a identificação do paciente ou de controlo.
2. Preencher uma pipeta descartável com amostra de soro ou plasma. Segurando a pipeta na vertical, colocar uma gota (25 µL) de amostra em cada poço (⇒).
3. Adicionar exactamente 6 gotas de solução tampão no poço de amostra (⇒).
4. Ler os resultados após 10-15 minutos. Não interpretar os resultados após decorridos mais de 15 minutos.



## 10. Interpretação de Resultados

### Positivo para IgG:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste "T" para IgG.



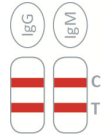
### Positivo para IgM:

Uma linha colorida surge em cada zona de controlo "C" e uma linha colorida desenvolve-se na região da linha de teste "T" para IgM.



### Positivo para IgG e IgM:

Além das linhas de controlo "C", uma linha de cor desenvolve-se em cada região da linha de teste "T" para IgG e IgM.



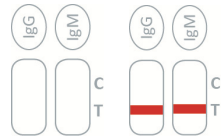
### Negativo:

Uma linha colorida surge na região da linha de controlo "C". Não aparecem linhas coloridas na região da(s) linha(s) de teste "T" para IgG e IgM.



### Inválido:

As linhas de controlo "C" não se desenvolvem. Resultados de qualquer teste no qual não tenha surgido uma linha de controlo no tempo de leitura especificado deverão ser desconsiderados.



As razões mais prováveis para um resultado inválido são o volume da amostra insuficiente, erros procedurais ou testes expirados. Por favor, rever o procedimento e repetir o teste com um novo teste cassete. Se o problema persistir, interromper a utilização do kit e contactar o distribuidor.

## 11. Controlo de qualidade

### Controlo interno:

A linha colorida que surge na região da linha de controlo "C", é considerada um controlo interno de procedimento. Isto confirma um volume de amostra suficiente, uma saturação de membrana adequada e o procedimento técnico correto.

### Controlo externo:

É recomendado o uso de controlos positivos e negativos tendo em vista o desempenho apropriado do teste.

## 12. Limitações

- O resultado obtido com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM não deve ser usado como o único critério para o diagnóstico de Borreliose Lyme.
- A resposta imunológica pode, em alguns pacientes, ser retardada. Durante o estágio primário (I) da doença (6), o qual é caracterizado pelo desenvolvimento de *erythema migrans*, os antígenos poderão ser detectados apenas 2-6 semanas após a mordida da carraça, e, ainda assim, apenas em 40 a 60 % dos casos. Durante o segundo estágio (II), o qual corresponde ao desenvolvimento de neuroborreliose aguda, os IgM e IgG são detectados em 70 a 90 % dos casos. Desta forma, no caso de um resultado negativo aquando do primeiro teste, recomenda-se a realização de um segundo teste 4 a 6 semanas após o mesmo para a verificação do nível de anticorpos. Durante o terceiro estágio da doença (III), o qual é caracterizado pela acrodermatite atrófica



crónica e artrite Lyme, os IgM e IgG são quase sempre detectáveis.

- Alguns factores, assim como a realização do teste num estádio muito precoce ou o tratamento prévio com antibiótico, poderão originar resultados falsos negativos. Isto deve-se a concentrações muito reduzidas de IgM anti-Borreliose que não são detectáveis pelo teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- Em alguns casos, o resultado positivo pode surgir devido à persistência de IgG ou IgM no corpo por mais de 10 anos após tratamento (7). Devido a reacções cruzadas observadas (ver tabela 2 para IgG e tabela 8 para IgM na secção "reacções cruzadas e especificidade analítica"), assim como com anticorpos anti-CMV para IgM, é importante ter cuidado com a interpretação do resultado obtido com o teste resultado NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- Os níveis de anticorpos podem ser variáveis, dependendo dos pacientes testados. A prevalência de anticorpos na população global aproxima-se dos 3% a 5%, enquanto que em sujeitos mais expostos à doença (guardas florestais, caminhantes) os anticorpos podem ser detectados em 25% a 30% dos casos (5).
- Assim como com outros procedimentos de diagnóstico, os resultados obtidos com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM devem ser avaliados por um médico juntamente com outras informações clínicas, uma vez que, por exemplo, pacientes padecendo de Borreliose poderão apresentar sintomas semelhantes aos da Sífilis (4).
- O teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM deverá ser usado em conjunto com outros critérios, assim como o histórico epidemiológico da região, os sintomas do paciente ou as limitações do teste.

**13. Características de Desempenho**

**Lyme IgG**

**Sensibilidade e especificidade diagnósticas**

141 amostras de soro de diferentes painéis de origem europeia foram pré-testadas pelo método EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin e Enzygnost Dade-Behring) e, em seguida, testados usando o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

**Tabela 1**

Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Referência método (EIA)		
	+	-	Total
	+	61	11
-	14	55	69
Total	75	66	141

Os desempenhos são calculados a partir dos dados apresentados na tabela abaixo:

Sensibilidade:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Especificidade:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Concordância geral:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

**Reacções cruzadas e especificidade analítica**

Foram testadas amostras de soro com um nível elevado de anticorpos anti-*Treponema pallidum*, factores reumatóides, anti-EBV, anti-CMV ou anticorpos anti-nucleares com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM de modo a avaliar possíveis interferências. Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

**Tabela 2**

Amostras positivas	Resultados positivos obtidos com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Número total de amostras
Sífilis	0	44
Factor reumatóide	2	30
anticorpos anti-EBV	0	30
anticorpos anti-CMV	0	30
anticorpos anti-nucleares	1	30
Número total de amostras	3	164

Os resultados mostram que poderão ocorrer reacções cruzadas com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM caso as amostras tenham níveis elevados de Fator Reumatóide ou anticorpos anti-nucleares. Contudo, a especificidade analítica global obtida quando estas amostras potencialmente interferentes são testadas, mantém-se nos 98,2% (161/164).

**Interferências**

Amostras de soro analisadas pelo método ELISA (Virothec) foram marcadas com hemoglobina humana (2,5 g/L), bilirrubina (0,3 g/L) ou triglicérides (10 g/L). Utilizando o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, estas amostras foram testadas paralelamente também sem serem marcadas.

Os resultados são apresentados nas tabelas seguintes:

**Tabela 3**

Amostras tituladas pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
		Referência sem hemoglobina	Tituladas com 2,5 g/L hemoglobina
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção)		
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (fraco positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (forte positivo)	47,5 (> 9)	+	+

**Tabela 4**

Amostras tituladas pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
		Referência sem bilirrubina	Tituladas com 0,3 g/L bilirrubina
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção)		
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (fraco positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (forte positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Tabela 5

Amostras tituladas pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
		Referência sem triglicerídeos	Tituladas com 10 g/L de triglicerídeos
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção)		
98 (negativo)	5,8 (> 9)	-	-
62 (fraco positivo)	20,4 (> 9)	+	+
91 (forte positivo)	47,5 (> 9)	+	+

Os resultados mostram que hemoglobina, bilirrubina ou triglicerídeos não interferem com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM nas concentrações de 2,5 g/L, 0,3 g/L 10 g/L, respectivamente.

### Lyme IgM

#### Sensibilidade e especificidade diagnósticas

251 amostras de soro de diferentes painéis de origem europeia foram pré-testadas pelo método EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin e Enzygnost Dade-Behring) e, em seguida, testadas usando o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

Tabela 6

Teste NADAL® Lyme Borreliose IgG/IgM (IgM)		Referência método (EIA)		
		+	-	Total
	+	139	16	155
-	14	82	96	
Total	153	98	251	

Os desempenhos são calculados a partir dos dados apresentados na tabela abaixo:

Sensibilidade:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Especificidade:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Concordância geral:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

#### Sensibilidade do diagnóstico nos 3 estádios clínicos da doença de Lyme

Foi realizado um estudo sobre a Borreliose num laboratório europeu de referência, utilizando amostras de soro correspondentes a diferentes estádios clínicos da doença de Lyme: Estádio I caracterizado por *erythema chronicum migrans* (EM); Estádio II caracterizado pelo desenvolvimento de neuroborreliose aguda (NB) e estádio III caracterizado pela acrodermatite atrófica crónica (ACA) e artrite Lyme(LA).

Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

Tabela 7

Estádio	Número de amostras	Número de amostras positivos		Sensibilidade em %
		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	ELISA DiaSorin (limite de sensibilidade: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Entre as amostras testadas, 4 amostras de estádio I, 5 amostras de estádio II e 7 amostras de estádio III, apresentaram um resultado positivo IgM muito fraco (titulações 1.5 vezes abaixo do limite de detecção).

#### Reacções cruzadas e especificidade analítica

Amostras de soro com um nível elevado de anticorpos anti-Treponema pallidum, factores reumatóides, anti-EBV, anti-CMV ou anticorpos anti-nucleares, foram testadas com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM de modo a avaliar possíveis interferências. Os resultados encontram-se na seguinte tabela:

Tabela 8

Amostras positivas	Resultados positivos obtidos com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Número total de amostras
Sífilis	6	53
Fator Reumatóide	1	30
anticorpos anti-EBV	3	30
anticorpos anti-CMV	9	30
anticorpos anti-nucleares	4	30
Número total de amostras	23	173

Os resultados mostram que poderão ocorrer reacções cruzadas com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM caso as amostras contenham níveis elevados de Fator Reumatóide ou anticorpos anti-nucleares. Contudo, a especificidade analítica obtida quando estas amostras potencialmente interferentes foram testadas, mantém-se nos 86,7% (150/173).

#### Interferências

Amostras de soro analisadas pelo método ELISA (DiaSorin, Euroimmun) foram marcadas com hemoglobina humana (5 g/L), bilirrubina (0,3 g/L) ou triglicerídeos (30 g/L). Utilizando o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, estas amostras foram testadas paralelamente também sem serem marcadas.

Os resultados são apresentados nas tabelas seguintes:

7. Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001- 33 : 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 MH

Tabela 9

Amostras tituladas pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção )	Referência sem hemoglobina	Tituladas com 5 g/L de hemoglobina
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (fraco positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (forte positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabela 10

Amostras titulados pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção )	Referência sem bilirrubina	Tituladas com 0,3 g/L bilirrubina
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (fraco positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (forte positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+

Tabela 11

Amostras titulados pelo método ELISA		Teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Número de amostras	Titulação em UA/mL (Limite de detecção )	Referência sem triglicérides	Tituladas com 30 g/L de triglicérides
19 (negativo)	6,9 (> 22)	-	-
43 (fraco positivo)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (forte positivo)	5,6 (> 0,8)	+	+

Os resultados mostram que hemoglobina, bilirrubina ou triglicérides não interferem com o teste NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM nas concentrações de 5 g/L, 0,3 g/L 30 g/L, respectivamente.

Efeito de ciclos de (des)congelamentos

Amostras de soro anti-*Borrelia* IgM negativas, fracas e fortes positivas que tenham sido congeladas e descongeladas 3 vezes não afectaram os resultados de teste.

#### 14. Referências

- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-borne Infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet* 352 : 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. *Reviews of Infectious Diseases*. 11/6 : S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. *Option Bio*. 387 : 20-21.
- La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.

### 1. Účel použití

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM je rychlý kvalitativní screeningový test k detekci lidských IgG a IgM proti evropským kmenům *Borrelia* v lidském séru a plazmě. Test slouží jako pomůcka ke stanovení diagnózy lymeské boreliózy (známé také jako lymeská nemoc). Test je určen pouze k profesionálnímu použití. Avšak test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM v případě pozitivního výsledku neumožňuje určení stádia nemoci.

### 2. Úvod a klinický význam

Lymeská borelióza (1) nebo lymeská nemoc je způsobena spirochetou *Borrelia burgdorferi sensu lato*, která je přenášena klíšťaty. Nakažlivá klíšťata, infikovaná *Borrelia burgdorferi sensu lato*, se vyskytují především v severní Americe (*Ixodes scapularis* nebo *Ixodes pacificus*) a v mírných oblastech západní Evropy (*Ixodes ricinus*). Evropské druhy klíšťat jsou přenašeči evropských kmenů *Borrelia*, jako např. *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2) a také *B. spielmanii* a *B. bavariensis*, které jsou také známé jako patogenní. *B. valaisiana* a *B. lusitanae* jsou považovány za potenciálně patogenní kmény. Vzhledem k velké podobnosti mezi kmény *Borrelia*, reagují IgG a IgM směřované proti různým druhům *Borrelia* křížově s antigenovým koktailem testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM - alespoň v případě evropských kmenů.

V 30% až 80% případech je vyrážka (*erythema chronicum migrans*) prvním klinickým příznakem nemoci, objevující se po 3 až 10 dnech na místě kousnutí klíštěte. O 1 až 3 měsíce později se projeví první neurologické příznaky, jako např. bolest hlavy nebo vážné poruchy jako myelitida (3) - a to dokonce i v nepřítomnosti *erythema chronicum migrans*. Pacienti mohou mnohem později i po několika letech po primární infekci vyvinout vážné komplikace, jako např. intermitentní záchvaty artikulární artritidy, myokarditidu nebo akrodermatitidu.

### 3. Princip testu

V testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM je použita jedinečná kombinace konjugátů proti lidských imunoglobulinů a barviva, vysoce purifikovaných nativních *B. burgdorferi* a *B. garinii*, jakož i rekombinantních antigenů *B. burgdorferi* na pevné fázi.

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM se skládá z plastové kazety obsahující dva vnitřní testovací proužky k detekci IgG nebo IgM. Po odběru vzorku plazmy nebo séra, přidejte několik kapek do každého otvoru pro vzorek (⇒) na testovací kazetě.

Když vzorek putuje membránou proužku (detekce IgM), naváží se konjugáty proti lidským imunoglobulinům a barviva na lidské IgM, přičemž se utvoří komplexy protilátky a antigenu. Stejným způsobem putuje vzorek membránou proužku (detekce IgG), kdy se konjugáty proti lidským imunoglobulinům a barviva naváží na lidské IgG, přičemž se utvoří komplexy protilátky a antigenu. V případě pozitivního výsledku se tyto komplexy naváží na specifické antigeny v oblasti (oblastech) testovací linie na testovacích kazetě a utvoří tak růžovou linii (růžové linie). V případě nepřítomnosti protilátek proti *Borrelia* se neutvoří žádné linie v oblastech testovací linie na testovacích kazetě. Reakční směs putuje dále membránou na testovací kazetě. Nenavázané konjugáty se naváží na čididla v každé oblasti kontrolní linie a utvoří tak růžovou linii, což potvrzuje,

že bylo přidáno přiměřené množství vzorku a membrána byla dostatečně promočena.

### 4. Čidla a dodávané materiály:

- 10 NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM testovacích kazet (vč. jednorázových plastových pipet)
- 1 původ obsahující detergent <0,1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6 ml)
- 1 návod k použití

### 5. Další potřebný materiál

- Stopky

### 6. Skladování a trvanlivost

Všechny součásti testovací sady NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM by měly být skladovány mezi +4°C a +30°C. Testovací kazeta musí zůstat až do použití v uzavřené ochranné fólii. Testovací sadu nezmrazujte. Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM je trvanlivý do data expirace uvedeného na obalu.

### 7. Varování a bezpečnostní opatření

- Pouze pro profesionální *in-vitro* diagnostiku.
- Před testováním si pečlivě přečtěte návod k použití.
- Nepoužívejte test po uplynutí data expirace, které je uvedeno na obalu.
- Test nepoužívejte, je-li ochranná fólie poškozena.
- Pouze k jednorázovému použití.
- Nenanášejte vzorek do reakční oblasti (výsledková oblast).
- Nedotýkejte se reakční oblasti (výsledková oblast), aby nedošlo ke kontaminaci.
- Pro každý vzorek použijte novou odběrovou zkumavku, aby se zabránilo křížové kontaminaci vzorků.
- Nezaměňujte a nemichejte komponenty z různých testovacích sad.
- Nejezte, nepijte ani nekuřte v místě, kde se zachází se vzorky a testovacími sadami.
- Během testování vzorků používejte ochranný oděv jako laboratorní plášť, jednorázové rukavice a ochranné brýle.
- Se všemi vzorky zacházejte, jako s potenciálně infekčními. V průběhu všech testovacích kroků dodržujte zavedená opatření pro prevenci mikrobiologických rizik a řiďte se standardními předpisy pro správnou likvidaci vzorků.
- Testovací souprava obsahuje produkty živočišného původu. Znalost původu a/nebo zdravotního stavu zvířat doložená certifikátem zcela nezaručuje absenci přenosných patogenů. Je tudíž doporučeno s těmito produkty zacházet jako s potenciálně infekčními a dle běžných bezpečnostních opatření (např. nepolykejte nebo nevedchujte).
- Pozitivní kontrola obsahuje azid sodný, který může reagovat s olověným nebo měděným potrubiím a mohou tak vzniknout potenciálně výbušné kovové azidy. Při likvidaci roztoku proto potrubí vždy propláchněte velkým množstvím vody, aby se zabránilo tvorbě azidů. Zabraňte kontaktu s očima a sliznicemi. V případě kontaktu důkladně vypláchněte vodou.
- Vlhkost a teplota mohou ovlivnit výsledky testu.
- Použité testovací materiály by měly být zlikvidovány v souladu s místními předpisy.

### 8. Odběr a příprava vzorku

#### Sérum nebo plazma (heparinát lithný/amonný nebo EDTA)

Vzorky by měly být odebrány za standardních laboratorních podmínek (např. asepticky a tak, aby se zabránilo hemolýze).

Pokud bude test proveden do 48 hodin po odběru vzorku, měly by vzorky být skladovány v chladničce při 2-8°C. Vzorky by měly být skladovány zmrazené, pokud test bude proveden po více než 48 hodinách po odběru vzorku. Zmrazené vzorky musí být před testováním zcela rozmrazeny, promíchány a přivedeny na pokojovou teplotu. Zamezte opakovanému zmrazení a rozmrazení vzorků.

V případě zakalení, vysoké viskozity nebo přítomnosti částic, by vzorky séra měly být před testováním zředěny se stejným množstvím (V/V) ředícího purfu (není dodáván, ale dostupný na požádání).

## 9. Provedení testu

Před testováním přiveďte testovací kazety, pufr, vzorky a/nebo kontroly na pokojovou teplotu (15-30°C).

- Vyjměte testovací kazetu ze zapečetěné ochranné fólie. Označte ji jménem pacienta nebo číslem kontroly.
- Naplňte jednorázovou pipetu vzorkem séra nebo plazmy. Držte pipetu svisle a naneste 1 kapku (25 µL) vzorku do každého otvoru pro vzorek (⇒).
- Přidejte přesně 6 kapek (200 µL) pufru do každého otvoru pro vzorek (⇒).
- Výsledek testu odečtěte po 10 až 15 minutách. Po 15 minutách již výsledek nevyhodnocujte.



## 10. Vyhodnocení výsledků

### Positivní pro IgG:

Jedna barevná linie se vytvoří v každé oblasti kontrolní linie "C" a jedna barevná linie se vytvoří v oblasti testovací linie "T" pro IgG.



### Positivní pro IgM:

Jedna barevná linie se vytvoří v každé oblasti kontrolní linie "C" a jedna barevná linie se vytvoří v oblasti testovací linie "T" pro IgM.



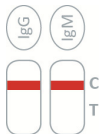
### Positivní pro IgG a IgM:

Kromě kontrolních linií "C" se zobrazí barevná linie v každé oblasti testovací linie "T" pro IgG a IgM.



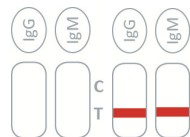
### Negativní:

Jedna barevná linie se objeví v oblasti kontrolní linie "C". V oblastech testovací linie "T" pro IgG a IgM se nezobrazí barevná linie.



## Neplatný:

Nezobrazí se kontrolní linie "C". Výsledky jakéhokoliv testu, na kterém se ve stanoveném čase pro odečítání neobjeví kontrolní linie, musí být znehodnoceny.



Nedostatečné množství vzorku, nesprávné provedení testu nebo prošlý test jsou nejpravděpodobnější důvody k nezobrazení kontrolní linie. Revidujte prosím postup a zopakujte test s novou testovací kazetou. Pokud problém přetrvává, přestaňte ihned používat testovací sadu a kontaktujte Vašeho distributora.

## 11. Kontrola kvality

### Interní kontrola:

Barevná linie, která se objeví v oblasti kontrolní linie (C) je považována za interní procedurální kontrolu. Potvrzuje přidání dostatečného množství vzorku, dostatečné promočení membrány a správný testovací postup.

### Externí kontrola:

K zajištění správné výkonnosti testu se doporučuje použití externích pozitivních a negativních kontrol.

## 12. Omezení

- Výsledky obdržené testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM by neměly být použity jako jediné kritérium ke stanovení diagnózy lymeské borreliózy.
- Imunitní reakce může být u nakažených pacientů opožděná. Během primární fáze (I) nemoci (6), která se vyznačuje vyvinutím *erythema migrans*, mohou IgM být detekovány 2 až 6 týdnů po kousnutí klíštětem a to pouze ve 40 až 60% případů. Během druhé fáze (II), která odpovídá vývinu akutní neuroborreliózy, jsou IgM a IgG detekovány v 70 až 90% případů. Z tohoto důvodu se doporučuje provedení dalšího testu o 4 až 6 týdnů později ke kontrole hladiny protilátek, pokud byl poprvé obdržen negativní výsledek. Během třetí fáze nemoci (III), která se vyznačuje chronickou atopickou akrodermatitidou a lymeskou artritidou, jsou IgM a IgG obvykle detekovatelné.
- Stejně faktory, jako např. velmi raná fáze infekce nebo předešlá léčba pacienta antibiotiky může vést k falešně negativním výsledkům. Důvodem k tomu je nízká koncentrace IgM proti *Borrelia*, kterou nelze detekovat za použití testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.
- Z důvodů persistence IgG nebo IgM může v některých případech být obdržen pozitivní výsledek i více než 10 let po léčbě (7). Vzhledem k pozorovaným křížovým reakcím (viz tabulka 2 pro IgG a tabulka 8 pro IgM v oddílu "Křížová reaktivita a analytická specifita") jako např. protilátky proti CMV pro IgM, je důležité stanovit konečné vyhodnocení výsledku obdržené testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM s opatrností.
- Hladina protilátek je variabilní a může se lišit v závislosti na testovaném pacientovi. Prevalence protilátek v celkové populaci se blíží 3 až 5%, zatímco u jedinců, kteří jsou hojně vystaveni bakteriím rodu *Borrelia* (lesníci, pěší turisté), mohou být protilátky detekovány v 25% až 30% případů (5).
- Stejně jako u všech diagnostických postupů musí údaje získané testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM být vyhodnoceny lékařem ve spojení s dalšími klinickými

informacemi, protože pacienti, kteří jsou nakaženi boreliózou, mohou vykazovat příznaky podobné příznakům syfilisu (4).

- Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM by měl být použit s ohledem na všechna kritéria, jako např. historická epidemiologická situace v dané oblasti, příznaky pacienta a omezení testu.

### 13. Výkonnostní charakteristiky

#### IgG proti lymbské borelióze

##### Diagnostická senzitivita a specifita

Z použití testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM bylo testováno 141 vzorků séra z různých panelů evropského původu. Tyto vzorky byly předem testovány EIA metodou (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin a Enzygnost Dade-Behring).

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 1

Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Referenční metoda (EIA)		
	+	-	Celkem
	+	61	11
-	14	55	69
Celkem	75	66	141

Výkonnost je následovně vypočítána z údajů, které jsou představeny ve výše uvedené tabulce:

Senzitivita:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Specifita:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Celková shoda:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Křížová reaktivita a analytická specifita

Za účelem posouzení možné interference byly testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM testovány vzorky séra obsahující vysoké hodnoty protilátek proti *Treponema pallidum*, revmatoidní faktory, protilátky proti EBV, proti CMV a antinukleární protilátky. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 2

Pozitivní vzorky	Pozitivní výsledky obdržené testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	Celkový počet vzorků
Syfilis	0	44
Revmatoidní faktor	2	30
Protilátky proti EBV	0	30
Protilátky proti CMV	0	30
Antinukleární protilátky	1	30
Celkový počet vzorků	3	164

Výsledky prokázaly, že může dojít ke křížové reakci s testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, pokud vzorky obsahují vysoké hodnoty revmatoidních faktorů nebo antinukleárních protilátek. Avšak celková analytická specifita obdržena testováním těchto potenciálně interferujících vzorků zůstává u 98,2% (161/164).

##### Interference

Do vzorků séra testovaných metodou ELISA (Virotech) byl přidán lidský hemoglobin (2,5 g/L), bilirubin (0,3 g/L) nebo triglyceridy (10 g/L). Za použití testu NADAL® Lyme Borreliosis

IgG/IgM byly tyto vzorky testovány paralelně i bez přidání uvedených látek.

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 3

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Počet vzorků	Titer v UA/mL (Cut-off)	Reference bez hemoglobinu	Přidáno 2,5 g/L hemoglobinu
98% (negativní)	5,8 (> 9)	-	-
62 (slabě pozitivní)	20,4 (> 9)	+	+
91 (silně pozitivní)	47,5 (> 9)	+	+

Tabulka 4

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Počet vzorků	Titer v UA/mL (Cut-off)	Reference bez bilirubinu	Přidáno 0,3 g/L bilirubinu
98% (negativní)	5,8 (> 9)	-	-
62 (slabě pozitivní)	20,4 (> 9)	+	+
91 (silně pozitivní)	47,5 (> 9)	+	+

Tabulka 5

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgG)	
Počet vzorků	Titer v UA/mL (Cut-off)	Reference bez triglyceridů	Přidáno 10 g/L triglyceridů
98% (negativní)	5,8 (> 9)	-	-
62 (slabě pozitivní)	20,4 (> 9)	+	+
91 (silně pozitivní)	47,5 (> 9)	+	+

Výsledky prokázaly, že hemoglobin, bilirubin a triglyceridy neinterferují s testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM až do koncentrace 2,5 g/L, 0,3 g/L a 10 g/L.

#### IgM proti lymbské borelióze

##### Diagnostická senzitivita a specifita

251 vzorků séra z různých panelů evropského původu, které byly předem testovány metodou EIA (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin a Enzygnost Dade-Behring), byly testovány testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM.

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

Tabulka 6

		Referenční metoda (EIA)		
Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	+	+	-	Celkem
	+	139	16	155
	-	14	82	96
	Celkem	153	98	251

Výkonnost je následovně vypočítána z údajů, které jsou představeny ve výše uvedené tabulce:

Senzitivita:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Specifita:  $82/98 \times 100 = 84\%$

Celková shoda:  $(139+82)/(153+98) \times 100 = 88\%$

### Diagnostická senzitivita ve 3 klinických fázích lymeské boreliózy

V evropské Referenční laboratoři byla provedena studie pro boreliózu za použití vzorků séra, které odpovídaly různým klinickým fázím lymeské boreliózy: *erythema chronicum migrans* (EM) je charakteristická pro fázi I; fáze II je spojená s vývojem akutní neuroboreliózy (NB) a fáze III se vyznačuje chronickou atropickou akrodermatidou (ACA) a lymeskou artritidou (LA).

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

**Tabulka 7**

Fáze	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků		Senzitivita v %
		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	DIASORIN ELISA (cut-off: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Mezi testovanými vzorky prokázaly 4 vzorky fáze I, 5 vzorků fáze II a 7 vzorků fáze III velmi slabě pozitivní výsledek pro IgM (titry pod 1,5 x cut-off hodnoty)

### Křížová reaktivita a analytická specifita

Za účelem posouzení možné interference byly testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM testovány vzorky séra obsahující vysoké hodnoty protilátek proti *Treponema pallidum*, revmatoidní faktory, protilátky proti EBV, proti CMV a antinukleární protilátky. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

**Tabulka 8**

Positivní	Positivní výsledky obdržené testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	Celkový počet vzorků
Syfilis	6	53
Revmatoidní faktory	1	30
Protilátky proti EBV	3	30
Protilátky proti CMV	9	30
Antinukleární protilátky	4	30
Celkový počet vzorků	23	173

Výsledky prokázaly, že může dojít ke křížové reakci s testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM, pokud vzorky obsahují vysoké hodnoty revmatoidních faktorů, protilátek proti *Treponema pallidum* nebo antinukleární protilátky. Avšak celková analytická specifita obdržená při testování těchto potencionálně interferujících vzorků činí 86,7% (150/173).

### Interference

Vzorky séra testované za použití různých metod ELISA (Diasorin, Euroimmun) byly obohaceny o lidský hemoglobin (5 g/L), bilirubin (0,3 g/L) nebo triglyceridy (30 g/L). Za použití testu NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM byly tyto vzorky testovány paralelně i bez přidání těchto látek.

Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce:

**Tabulka 9**

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Počet vzorků	Titer UA/mL (Cut-off)	Reference s hemoglobinem	Přidáno 5 g/L hemoglobinu
19% (negativní)	6,9 (> 22)	–	–
43 (slabě pozitivní)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (silně pozitivní)	5,6 (> 0,8)	+	+

**Tabulka 10**

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Počet vzorků	Titer v UA/mL (Cut-off)	Reference bez bilirubinu	Přidáno 0,3 g/L bilirubinu
19% (negativní)	6,9 (> 22)	–	–
43 (slabě pozitivní)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (silně pozitivní)	5,6 (> 0,8)	+	+

**Tabulka 11**

Vzorky titrované metodou ELISA		Test NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM (IgM)	
Počet vzorků	Titr v UA/mL (Cut-off)	Reference bez triglyceridů	Přidáno 30 g/L triglyceridů
19 (negativní)	6,9 (> 22)	–	–
43 (slabě pozitivní)	1,6 (> 0,8)	+	+
1,6 (silně pozitivní)	5,6 (> 0,8)	+	+

Výsledky prokázaly, že hemoglobin, bilirubin a triglyceridy neinterferují s testem NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM až do koncentrace 5 g/L, 0,3 g/L a 30 g/L.

### Účinky cyklů mraznutí a tání

Poté co negativní, slabě pozitivní a silně pozitivní vzorky séra pro IgM proti *Borrelia* prošly 3 cykly mraznutí a tání, nebyl výsledek testu ovlivněn.

### 14. Reference

- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-Borne infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352 : 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6 : S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borrelíose de Lyme. Option Bio. 387 : 20-21.
- La borrelíose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
- Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33 : 780-5.

Rev. 0, 2017-12-15 AG

### 1. Bruksområde

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test er en kvalitativ hurtigtest for påvisning av humant IgG og IgM til europeiske stammer av Borrelia i humant serum og plasma. Testen er beregnet for bruk som hjelpemiddel ved diagnosen av Lyme-sykdom, også kjent som Lyme borreliosis, og er kun beregnet for profesjonelt bruk. NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test gir ikke indikasjon på sykdomsstadiet til pasienten når testen viser et positivt resultat.

### 2. Introduksjon og Klinisk Signifikans

Lymesykdom (1) eller Lyme borreliosis er forårsaket av spirochete Borrelia burgdorferi sensu lato, som overføres av flått. Smittsomme ticks, infisert av Borrelia burgdorferi sensu lato, finnes hovedsakelig i Nord-Amerika (*Ixodes scapularis* eller *Ixodes pacificus*) og i tempererte områder i Vest-Europa (*Ixodes ricinus*). Europeiske tick arter er vektorer av europeiske Borrelia stammer, for eksempel *B.burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* (2) så som *B. spielmanii* og *B. bavariensis*, som er kjent for å være patogenisk. *B. Valaisiana* og *B. lusitaniae* anses også for å være potensielt patogene stammer. På grunn av likheten av Borrelia-stammer, krysser IgG og IgM rettet mot forskjellige Borrelia-arter med antigencocktailen av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test - i hvert fall når det gjelder europeiske stammer.

I 30% til 80% av tilfellene er hudutslett (erytem chronicum migrans) det første kliniske tegn på infeksjon, som opptrer etter 3 til 10 dager på tettebittens sted. Mellom 1 og 3 måneder senere, vises de første nevrologiske tegnene, som for eksempel hodepine eller alvorlige lidelser som myelitt (3) - selv i mangel av erytem kronisk migrans. Pasienter kan også utvikle alvorlige komplikasjoner, som for eksempel intermitterende angrep av leddgikt, myokarditt eller akrodermatitt mye senere, selv flere år etter den primære infeksjonen.

### 3. Testprinsipp

En unik kombinasjon av anti-humane immunglobuliner-fargekonjugater og høyt rensed innfødt *B. burgdorferi* og *B. garinii* samt rekombinante *B. burgdorferi*-antigener i den faste fase brukes i NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test for spesifikt å detektere anti-Borrelia antistoffer.

NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test omfatter et plasthus som inneholder to interne teststrimler for påvisning av IgG eller IgM. Etter innsamling av et plasma- eller serumprøve settes noen få dråper av prøven til hver prøvebrønn (→) av testkassetten.

Når prøven migrerer langs membranen (IgM-deteksjon), binder anti-humane immunglobuliner-fargekonjugater til humant IgM, som danner antistoff-antigenkomplekser. På samme migrerer prøven langs membranen (IgG-deteksjon), hvor anti-humane immunoglobuliner-fargekonjugatene binder til det humane IgG, som danner antistoff-antigenkomplekser. I tilfelle av positive resultater binder disse kompleksene til de spesifikke antigenene i testlinjegruppen (er) i testkassetten og frembringer (a) rosa linje (r). I fravær av anti-Borrelia-antistoffer, vises ingen linjer i testområdet av testkassetten. Reaksjonsblandingen fortsetter å migrere langs membranene i testkassetten. Ubundne konjugater binder til reagensene i hver kontrollinje-gruppe, og produserer en rosa linje som viser

at det riktige volumet av prøven er blitt tilsatt og membranavvik har oppstått.

### 4. Reagenser og materialer som følger med

- 10 NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM testkassetter (inkl. Engangs plastpipetter)
- 1 buffer inneholder vaskemiddel og <0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6 ml)
- 1 pakkevedlegg

### 5. Tillleggsmateriale

- Timer

### 6. Oppbevaring & Stabilitet

Alle NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM test kit komponenter skal lagres mellom +4°C og +30°C. Kassetten må forbli i den forseglede emballasjen inntil bruk. Tester skal ikke fryses. NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test er stabil til utløpsdatoen som er angitt på pakken.

### 7. Advarsler og Forholdsregler

- Kun for profesjonell *in-vitro* diagnostisk bruk.
- Les nøye gjennom testprosedyren før testing.
- Ikke bruk teksten etter utløpsdatoen som er angitt på pakken.
- Ikke bruk testen hvis emballasjen er skadd.
- Ikke gjenbruk tester.
- Ikke legg til prøvematerialet i reaksjonsområdet (resultat området).
- For å unngå forurensning og smitte, ikke rør reaksjonsområdet (resultat området).
- Unngå tverrforurensning av prøver ved å bruke et nytt prøveinnsamlingsrør for hver prøve som tas.
- Ikke erstatt eller bland komponenter fra forskjellige testsett.
- Ikke spis, drikk eller røyk i området der prøver og testsett håndteres.
- Bruk verneklær som laboratoriefrakker, engangshansker og vernebriller når prøvene blir analysert.
- Håndter alle prøver som om de inneholder smittestoffer. Observer etablerte forholdsregler for mikrobiologiske farer gjennom alle prosedyrer og standard retningslinjer for korrekt avhandling av prøver.
- Testsettet inneholder produkter av animalsk opprinnelse. Sertifisert kunnskap om opprinnelse og/eller sanitær tilstand av dyrene garanterer ikke fravær av smittestoffer. Det anbefales derfor at disse produktene behandles som potensielt smittefarlig, og behandles i samsvar med vanlige sikkerhetsregler (f.eks ikke svælg eller innhaler).
- Fortynningsvæsken inneholder natriumazid, som kan reagere med bly eller kobber vann for å danne potensielt eksplosive metallazider. Når du kaster denne løsningen, skyll alltid med store mengder vann for å hindre acid oppbygging. Unngå kontakt med øyne eller slimhinner. Ved tilfeldig kontakt, skyll grundig med vann.
- Fuktighet og temperatur kan påvirke testresultatene.
- Brukt testmateriale skal kastes i henhold til lokale forskrifter.



## 8. Prøvetaking og Klargjøring

**Serum eller plasma (lithium or ammonium heparinate, EDTA)**  
Prøver bør samles under standard laboratoriebetingelser (dvs. aseptisk og på en måte å unngå hemolyse).

Dersom testen skal utføres innen 48 timer etter prøveopsamling, skal prøver lagres i kjøleskapet ved 2-8 °C. Prøver bør oppbevares frosset hvis testen skal utføres etter mer enn 48 timer etter prøveinnsamling. Frosne prøver må fullstendig tines, blandes grundig og tas med til romtemperatur før testingen. Unngå repeterende fryse og tine sykklur.

I tilfelle turbiditet, høy viskositet eller tilstedeværelse av partikler i serumprøver, bør de fortynnes med et likt volum (V/V) fortynningsbuffer (ikke tilgjengelig, men tilgjengelig på forespørsel) før testing.

## 9. Test Prosedyre

**Ta testkassetten, bufferen, prøven og/eller kontrollene til romtemperatur (15-30°C) før testing.**

1. Fjern testkassetten fra den forseglede emballasjen. Merk det med pasientens navn eller kontrollnummer.
2. Fyll engangspipett med serum- eller plasmaprøven. Hold pipetten vertikalt, dispenser 1 dråpe (25 µl) av prøven i hver prøvebrønn (⇒).
3. Tilsett nøyaktig 6 dråper (200 µl) buffer til hver prøvebrønn (⇒).
4. Les av test resultatet etter 10 - 15 minutter. Ikke tolk resultatet etter mer enn 15 minutter.



10-15 min

## 10. Tolkning av resultatet

### Positiv for IgG:

En farget linje vises i hvert kontrollinjeområde 'C' og en farget linje utvikles i testlinjegruppen 'T' for IgG.



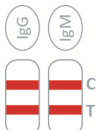
### Positiv for IgM:

En farget linje utvikles i hver kontrollinjeområde 'C' og en farget linje utvikles i testlinjegruppen 'T' for IgM.



### Positiv for IgG og IgM:

I tillegg til kontrollinjene 'C' utvikles en farget linje i hver testlinjeområde 'T' for IgG og IgM.



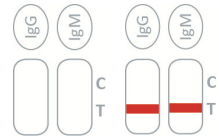
### Negativ:

En farget linje vises i hvert kontrollinjeområde 'C'. Ingen fargede linjer vises i testlinjene 'T' for IgG og IgM.



## Ugyldig:

Kontroll linjene 'C' vises ikke. Resultater fra enhver test som ikke har produsert kontroll linjer ved den angitte lesetiden må kastes.



Utilstrekkelig prøvevolum, feil driftsprosedyre eller utlørte tester er de mest sannsynlige årsakene til manglende kontrollinje. Gå gjennom prosedyren og gjenta testen med en ny testkasset. Hvis problemet vedvarer må du slutte å bruke testsettet umiddelbart og kontakte din forhandler.

## 11. Kvalitetskontroll

### Intern kontroll:

En farget linje som vises i kontrollinjegruppen "C" betraktes som en intern prosesskontroll. Det bekrefter tilstrekkelig prøvevolum og riktig prosedyreteknikk.

### Ekstern kontroll:

Bruk av eksterne positive og negative kontroller anbefales for å sikre riktig analysepåvirkning.

## 12. Begrensninger

- Resultatet som ble oppnådd med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test, bør ikke brukes som eneste metode for diagnose av lyme borreliosis.
- Immunrespons kan være forsinket hos infiserte pasienter. I den innledende fasen (I) av sykdommen (6), som er preget av utviklingen av erytem migrans, kan IgM bare oppdages 2 til 6 uker etter bittet, og selv da bare i 40 til 60% av tilfellene. I andre trinn (II), som tilsvarer utviklingen av akutt neuroforløse, påvises IgM og IgG i 70 til 90% av tilfellene. Derfor, hvis et negativt resultat ble oppnådd første gang, anbefales det å utføre en annen test 4 til 6 uker senere for å kontrollere antistoffnivået. I tredje fase av sykdommen (III), som er preget av kronisk atrofisk akrodermatitt og Lyme artritt, er IgM og IgG vanligvis detekterbare.
- Noen faktorer, som for eksempel et veldig tidlig stadium av infeksjon eller tidligere behandling av pasienten av antibiotika, kan føre til falske negative resultater. Dette skyldes en lav anti-Borrelia IgM konsentrasjon som ikke kan detekteres ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.
- I noen tilfeller kan et positivt resultat oppnås på grunn av persistensen av IgG eller IgM i mer enn 10 år etter behandling (7). På grunn av observerte kryssreaksjoner (se tabell 2 for IgG og tabell 8 for IgM i avsnittet "Kryssreaksjoner og analytisk spesifisitet"), som med anti-CMV-antistoffer for IgM, er det viktig å være forsiktig i den endelige tolkningen av testresultatet som oppnås med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.
- Antikropp nivå kan variere, avhengig av pasienten som testes. Forekomsten av antistoffer i totalpopulasjonen er nær 3% til 5%, mens hos eksponerte personer (skogbrukere, vandrere) kan antistoffer detekteres i 25% til 30% av tilfellene (5).
- Som med en hvilken som helst diagnostisk prosedyre, bør data oppnådd med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test evalueres av legen sammen med annen klinisk informasjon, da pasienter som lider av borreliosis, kan ha symptomer som ligner syfilis (4).

- NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test bør brukes sammen med alle kriterier, for eksempel den historiske epidemiologiske situasjonen i regionen, pasientens symptomer, samt testbegrensninger.

### 13. Ytelseskarakteristikk

#### Lyme IgG

##### Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet

141 serumprøver fra forskjellige paneler av europeisk opprinnelse forhåndsanalyisert ved EIA-metode (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin og Enzygnost Dade-Behring) ble testet ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.

Resultatene er presentert i tabellen nedenfor:

Tabell 1

		Referanse metode (EIA)		
		+	-	Total
NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	+	61	11	72
	-	14	55	69
	Total	75	66	141

Opptreden beregnes ut fra dataene i tabellen ovenfor som følger:

Sensitivitet:  $61/75 \times 100 = 81\%$

Spesifisitet:  $55/66 \times 100 = 83\%$

Total overensstemmelse:  $(61+55)/(75+66) \times 100 = 82\%$

##### Analytisk Spesifisitet

Serumprøver som inneholder høye nivåer av anti-Treponema pallidum antistoffer, reumatoidfaktorer, anti-EBV, anti-CMV eller antinuclear antistoffer ble testet ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test for å evaluere mulige interferenser. Resultatene er presentert i tabellen nedenfor:

Tabell 2

Positive prøver	Positive resultater oppnådd med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	Totalt nummer av prøver
Syfilis	0	44
Reumatoid faktor	2	30
anti-EBV antikropper	0	30
antikropper	0	30
antinukleære antikropper	1	30
Totalt nummer av prøver	3	164

Resultatene viser at kryssreaksjoner kan forekomme med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test hvis prøver inneholder høye nivåer av reumatoidfaktorer eller antinucleære antistoffer. Den totale analytiske spesifisitet som oppnås ved testing av disse potensielt forstyrrende eksempler, forblir imidlertid 98,2% (161/164).

##### Interferens

Serumprøver som ble analysert ved ELISA-metode (Virotech) ble spikket med humant hemoglobin (2,5 g/L), bilirubin (0,3 g/L) eller triglyserider (10 g/L). Ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test ble disse prøvene testet parallelt også uten å bli spiket.

Resultatene presenteres i henholdsvis følgende tabeller:

Tabell 3

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Henvising uten hemoglobin	Spiked med 2,5 g/L hemoglobin
Antall prøver	Titer i UA/mL (Cut-off)		
98 (negativ)	5,8 (> 9)	-	-
positiv	20,4 (> 9)	+	+
positiv	47,5 (> 9)	+	+

Tabell 4

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Referanse uten bilirubin	Spiked med 0,3 g/L av bilirubin
Antall prøver	Titer i UA/mL (Cut-off)		
98 (negativ)	5,8 (> 9)	-	-
positiv	20,4 (> 9)	+	+
positiv	47,5 (> 9)	+	+

Tabell 5

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgG)	
		Referanse uten triglyserides	Spiked med 10 g/L av triglyserides
Antall prøver	Titer in UA/mL (Cut-off)		
98 (negativ)	5,8 (> 9)	-	-
positiv	20,4 (> 9)	+	+
91 (sterk positiv)	47,5 (> 9)	+	+

Resultatene viser at hemoglobin, bilirubin og triglyserider ikke forstyrrer NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test opp til konsentrasjoner på henholdsvis 2,5 g/l, 0,3 g/l og 10 g/l.

##### Lyme IgM

##### Diagnostisk sensitivitet og spesifisitet

251 serumprøver fra forskjellige paneler av europeisk opprinnelse forhåndsanalyisert ved EIA-metode (miniVIDAS® Biomérieux, Liaison Diasorin og Enzygnost Dade-Behring) ble testet ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test.

Resultatene er presentert i tabellen nedenfor:

Tabell 6

		Referansemetode (EIA)		
		+	-	Total
NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	+	139	16	155
	-	14	82	96
	Total	153	98	251

Opptreden beregnes ut fra dataene i tabellen ovenfor som følger:

Sensitivitet:  $139/153 \times 100 = 91\%$

Spesifisitet: 82/98 x 100 = 84%

Total overensstemmelse: (139+82)/(153+98) x 100 = 88%

### Diagnostisk sensitivitet

En studie ble utført i et europeisk referanselaboratorium for borreliosis ved bruk av serumprøver tilsvarende ulike kliniske stadier av Lyme-sykdommen: stadium I preget av erytem chronicum migrans (EM); stadium II som svarer til utviklingen av akutt nevroborreliosis (NB) og stadium III karakterisert ved kronisk atrofisk akrodermatitt (ACA) og Lyme arthritis (LA).

Resultatene er presentert i tabellen nedenfor:

**Tabell 7**

Stadie	Antall prøver	Antall positive prøver		Sensitivitet %
		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	DIASORIN ELISA (cut off: > 1,10)	
EM	40	21	39	53,8
NB	19	2	13	15,4
ACA	31	3	17	17,6

Blant de testede prøvene viste 4 prøver av stadium I, 5 prøver av fase II og 7 prøver av fase III et svært svakt IgM positivt resultat (titre under 1,5 x cut-off verdi).

### Kryssreaksjoner og Analytisk Spesifisitet

Serumprøver som inneholder høye nivåer av anti-Treponema pallidum antistoffer, reumatoidfaktorer, anti-EBV, anti-CMV eller antinuclear antistoffer ble testet ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test for å evaluere mulige interferenser. Resultatene er presentert i tabellen nedenfor:

**Tabell 8**

Positive prøver	Positive resultater oppnådd med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	Totalt nummer av prøver
Syfilis	6	53
Reumatoid Faktorer	1	30
anti-EBV antikropper	3	30
anti-CMV antikropper	9	30
antinukleære antikropper	4	30
Totalt nummer av prøver	23	173

Resultatene viser at kryssreaksjoner kan forekomme med NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test hvis prøver inneholder høye nivåer av reumatoidfaktorer, anti-Treponema pallidum antistoffer eller antinuclear antistoffer. Den totale analytiske spesifisitet som oppnås ved testing av disse potensielt forstyrrende eksempler, forblir imidlertid 86,7% (150/173).

### Interferens

Serumprøver som ble analysert ved hjelp av forskjellige ELISA-metoder (Diasorin, Euroimmun) ble spiket med humant hemoglobin (5 g/L), bilirubin (0,3 g/L) eller triglyserider (30 g/L). Ved bruk av NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test ble disse prøvene testet parallelt også uten å bli spiket.

Resultatene presenteres i henholdsvis følgende tabeller:

**Tabell 9**

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Antall prøver	Titer in UA/mL (Cut-off)	Henvisning uten hemoglobin	5 g/L
19 (negativ)	6,9 (> 22)	-	-
43 (svak positive)	1,6 (> 0,8)	+	+
positiv	5,6 (> 0,8)	+	+

**Tabell 10**

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Antall prøver	Titer i UA/mL (Cut-off)	Referanse uten bilirubin	Spiked med 0,3 g/L av bilirubin
19 (negativ)	6,9 (> 22)	-	-
43 (svak positive)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (sterk positiv)	5,6 (> 0,8)	+	+

**Tabell 11**

Eksempler titrert ved hjelp av ELISA-metoden		NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test (IgM)	
Antall prøver	Titer in UA/mL (Cut-off)	Referanse uten triglycerides	Spiked med 30 g/L av triglycerides
19 (negativ)	6,9 (> 22)	-	-
43 (svak positive)	1,6 (> 0,8)	+	+
39 (sterk positiv)	5,6 (> 0,8)	+	+

Resultatene viser at hemoglobin, bilirubin og triglyserider ikke forstyrrer NADAL® Lyme Borreliosis IgG/IgM Test opp til konsentrasjoner på henholdsvis 5 g/l, 0,3 g/l og 30 g/l.

### Effekt på fryse-tine sykluser

Negative, svake positive og sterke positive anti-Borrelia IgM serumprøver som har gjennomgått 3 fryse-tine-sykluser, viste ikke noen effekt på testresultatene.





### 14. Referanser











- Marques, A.R., Hornung, R.L., Dally, L. and Philipp, M.T. 2005. Detection of Immune Complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with Borrelia burgdorferi. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12/9: 1036-1040.
- Lyme Disease and Related Tick-Borne infections. 2001. Southwestern Vermont Health Care.
- Nadelman, R.B. and Wormser, G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet 352 : 557-565.
- Duray, P.H. 1989. Clinical pathologic correlations of Lyme disease. Reviews of Infectious Diseases. 11/6 : S1487-S1493.
- Bertholom, C. 2007. Place et intérêt des méthodes du diagnostic biologique au cours de la borréliose de Lyme. Option Bio. 387 : 20-21.
- La borréliose de Lyme. Rapport du groupe de travail. HCSP. 28 Mars 2014.
- Kalish, R.A., Granquist, G., Shea, J., Ruthazer, B. et al. 2001. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to Borrelia burgdorferi 10-20 years after active Lyme disease. Clin Infect Dis 2001- 33 : 780-5.







Symbol	Deutsch	English	Français	Español	Italiano	Polski
	CE Konformitätszeichen	CE marking of conformity	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea	Znak zgodności CE
	Gebrauchsanweisung beachten	Consult instructions for use	Consulter la notice d'utilisation	Consúltense las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso	Przestrzegać instrukcji obsługi
	<i>in-vitro</i> -Diagnostika	<i>in-vitro</i> diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic <i>in-vitro</i>	Producto sanitario para diagnóstico <i>in-vitro</i>	Dispositivo medico-diagnostico <i>in-vitro</i>	Tylko do diagnostyki <i>in-vitro</i>
	Temperaturbegrenzung	Temperature limitation	Limites de température	Límite de temperatura	Limiti di temperatura	Temperatura przechowywania
	Chargenbezeichnung	Batch code	Numéro de lot	Código de lote	Codice lotto	Numer serii
	Nicht zur Wiederverwendung	Do not reuse	Ne pas réutiliser	No reutilizar	Non riutilizzare	Tylko do jednorazowego użytku
	Verwendbar bis	Use by	Utiliser jusqu'au	Fecha de caducidad	Utilizzare entro	Data ważności
	Bestellnummer	Catalogue Number	Référence du catalogue	Número de catálogo	Riferimento di Catalogo	Numer katalogowy
	Hersteller	Manufacturer	Fabricant	Fabricante	Fabbricante	Producent
	Ausreichend für <n> Ansätze	Sufficient for <n> tests	Suffisant pour "n" tests	Suficiente para <n> utilizations	Sufficiente per "n" saggi	Wystarczający na <n> Powtórzeń

Symbol	Português	Český	Suomi	Svenskt	Nederlands	Dansk	Norsk
	Conformidade com as normas europeias	CE certifikát	CE-merkitty	CE-märkning	CE-markering	CE-mærkning	CE standardisert
	Consultar as instruções de utilização	Viz návod k použití	Katso käyttöohjetta	Läs bruksanvisningen	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Se brugsanvisningen	Les bruksanvisning nøye
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in-vitro</i>	Diagnostický zdravotnický prostředek <i>in-vitro</i>	<i>in-vitro</i> - diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite	Medicinteknisk produkt avsedd för <i>in-vitro</i> -diagnostik	Medisch hulpmiddel voor <i>in-vitro</i> diagnostiek	Medicinsk udstyr til <i>in-vitro</i> -diagnostik	<i>in-vitro</i> diagnostic medisinsk enhet
	Limites de temperatura	Teplotní omezení	Lämpötilarajat	Temperaturbegränsning	Temperatuurlimiet	Temperaturbegrænsning	Temperaturbegrensning
	Código do lote	Kód šarže	Eräkoodi	Satsnummer	Code van de partij	Batchkode	Merking
	Não reutilizar	Pro jednorázové použití	Kertäkäyttöinen	Får inte återanvändas	Niet opnieuw gebruiken	Må ikke genbruges	Må ikke brukes om igjen
	Prazo de validade	Spotřebuje do	Käytettävä viimeistään	Används före	Houdbaar tot	Udløbsdato	Tidtaking
	Número de catálogo	Katalogov číslo	Luettelonumero	Listnummer	Catalogus nummer	Best il l ingsnummer	Katalog nummer
	Fabricante	Výrobce	Valmistaja	Tillverkare	Fabrikant	Fabrikant	Produsent
	Suficiente para <n> test	Dostačuje pro <n> testů	Lukumäärä <n> test	Räcker till <n> test	Voldoende voor <n> test	Tilstrækkeligt til <n> test	Tilstrækkelig for <n> tester

## Our Teams

### Germany:

#### Regensburg

Tel: +49 941 290 10-0

Fax: +49 941 290 10-50

#### Moers

Tel: +49 2841 99820-0

Fax: +49 2841 99820-1

#### Austria:

Tel: +49 941 290 10-29

Free Tel: 0800 291 565

Fax: +49 290 10-50

Free Fax: 0800 298 197

#### UK & Ireland:

Tel: +49 941 290 10-18

Free Tel –UK: 0808 234 1237

Free Tel – IRE: 1800 555 080

Fax: +49 290 10-50

#### France:

France Tel: 0800 915 240

France Fax: 0800 909 493

### Switzerland

Swiss Tel: 0800 564 720

Swiss Fax: 0800 837 476

### Belgium

Belgium Tel: 0800 718 82

Belgium Fax: 0800 747 07

### Luxembourg

Lux. Tel: 800 211 16

Lux. Fax: 800 261 79

### Spain:

Tel: +49 941 290 10-759

Free Tel: 900 938 315

Fax: +49 941 290 10-50

Free Fax: 900 984 992

### Italy:

Tel: +49 941 290 10-34

Fax: +49 941 290 10-50

### Poland:

Tel: +49 941 290 10-44

Free Tel: 00 800 491 15 95

Fax: +49 941 290 10-50

Free Fax: 00 800 491 15 94

### Portugal:

Tel: +49 941 290 10-735

Tel. Verde: 800 849 230

Fax: +49 941 290 10-50

Fax Verde: 800 849 229

### Netherlands:

Tel: +31 30 75 600

Free Tel: 0800 0222 890

Fax: +31 70 30 30 775

Free Fax: 0800 024 9519

### Nordic countries (Finland, Norway, Sweden, Denmark):

Tel: +31 703075 607

Free Tel: +45 80 88 87 53

Tax: +31 703030 775

### Laboratory Diagnostics Team:

Tel: +49 941 290 10-40

Fax: +49 941 290 10-50

