

USO PREVISTO

El sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA es un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos del tipo IgM frente a *Borrelia burgdorferi* en el suero humano. Se ha ideado este ensayo diseñado para el análisis de muestras de suero de pacientes con síntomas o sospecha de enfermedad de Lyme.

Si los resultados de los análisis realizados con el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA son positivos para los anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*, deben realizarse análisis confirmatorios adicionales mediante uno de los siguientes métodos:

(1) Método de análisis confirmatorio estándar (MACE) de IgM mediante inmunoelectrotransferencia y de acuerdo con las guías actuales,

o

(2) Método de análisis confirmatorio modificado (MACM) mediante el sistema de análisis de IgG/IgM para VlsE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA.

Un análisis con resultado positivo de acuerdo con un MACE o un MACM es indicativo de presencia de anticuerpos y exposición a *Borrelia burgdorferi*, que es la bacteria responsable de la enfermedad de Lyme. Para elaborar un diagnóstico de enfermedad de Lyme, deben verificarse la presencia de anticuerpos frente a *Borrelia burgdorferi*, los antecedentes, los síntomas y otros datos analíticos.

RELEVANCIA Y ANTECEDENTES

Borrelia burgdorferi es la espiroqueta que provoca la enfermedad de Lyme. Las garrapatas del género *Ixodes* transmiten este microorganismo. En las regiones endémicas, estas garrapatas viven en la vegetación y en algunos animales, como los ciervos, los ratones, los perros, los caballos y los pájaros. La infección por *Borrelia burgdorferi* comparte ciertas características con otras infecciones por espiroquetas (enfermedades causadas por tres géneros en humanos: *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*). La piel es el punto de entrada de *B. burgdorferi*; la picadura de la garrapata suele provocar una erupción cutánea característica, denominada *eritema migratorio* (EM). El EM aparece en torno a la picadura de la garrapata en el 60 a 80 % de los pacientes. La espiroquetemia se produce con rapidez y se extiende por todos los tejidos y humores corporales.

La enfermedad de Lyme presenta distintas etapas, frecuentemente con períodos de latencia intercalados y distintos signos clínicos. La enfermedad de Lyme suele dividirse en tres etapas, en las que se producen síntomas mixtos. Los síntomas varían en función de las zonas afectadas por la infección, como las articulaciones, la piel, el sistema nervioso central, el corazón, los ojos, los huesos, el bazo y los riñones. Las fases tardías de la enfermedad suelen vincularse con la artritis y los síndromes del SNC. La infección puede ser asintomática y no tener trascendencia clínica hasta alcanzadas las etapas más tardías.

Los pacientes generan anticuerpos del tipo IgM durante las semanas inmediatamente posteriores a la aparición del EM y anticuerpos del tipo IgG con mayor lentitud (1). Los anticuerpos del tipo IgG e IgM pueden detectarse durante años.

Se ha conseguido aislar *B. burgdorferi* de biopsias cutáneas, sangre y líquido cefalorraquídeo. No obstante, estos métodos de detección directos por cultivo no siempre resultan útiles para el diagnóstico general de la borreliosis de Lyme. Algunos de los métodos de análisis de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* son el fluoroinmunoanálisis (FIA), la inmunotransferencia y el enzoinmunoanálisis (EIA).

B. burgdorferi es una bacteria compleja por lo que respecta a los antígenos, con cepas que varían considerablemente. Al principio, los anticuerpos suelen responder a la flagelina, que presenta componentes de reacción cruzada. Es posible que los pacientes que están en las etapas iniciales de la infección no generen valores detectables de anticuerpos. Por otro lado, el tratamiento antibiótico precoz derivado de la aparición del EM puede disminuir o evitar una buena respuesta. Algunos pacientes no generan nunca cantidades detectables de anticuerpos. Por lo tanto, los análisis serológicos de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* presentan una sensibilidad y una especificidad bajas. Esta falta de precisión implica que no se pueden usar los análisis de forma exclusiva para determinar el diagnóstico de enfermedad de Lyme (3, 4).

En 1994, en el Segundo Congreso Nacional sobre el Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Lyme se recomendó un sistema analítico de dos niveles, dirigido a normalizar los análisis serológicos de *B. burgdorferi*. Dado que el EIA y el FIA no son lo suficientemente específicos como para respaldar el diagnóstico clínico, se recomendó realizar análisis adicionales de las muestras positivas o dudosas procedentes de EIA y FIA (primera etapa), utilizando análisis basados en inmunoelectrotransferencia (segunda etapa) para la detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (los análisis basados en inmunoelectrotransferencia para la detección de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* son complementarios en vez de confirmatorios, pues su especificidad no es óptima, en especial para la detección de IgM). Si el resultado del análisis confirmatorio es positivo, se considera que existen signos de exposición a *B. burgdorferi*, lo que podría respaldar el diagnóstico clínico de enfermedad de Lyme. No obstante, esto no debe usarse como criterio único de diagnóstico. A ese supuesto se le suele denominar "método de análisis confirmatorio estándar" (MACE). En ciertos estudios recientes (17, 18, 19) se ha demostrado que usar un segundo ensayo ELISA en lugar de la inmunotransferencia de *Borrelia* puede dar lugar a un método de análisis confirmatorio modificado (MACM), comparable con el MACE.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se ha ideado el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA para detectar anticuerpos del tipo IgM frente a *B. burgdorferi* en suero humano. Se deben preparar los pocillos sensibilizados de las tiras de micropocillos de plástico mediante adsorción pasiva con un antígeno celular completo de *Borrelia burgdorferi*. El procedimiento analítico se divide tres etapas de incubación:

1. Los sueros de prueba se diluyen con el diluyente de muestras y luego se combinan con la solución absorbente proporcionada. La solución absorbente contiene un anticuerpo frente a la IgG humana, que precipita para eliminar la IgG y el factor reumatoide de la muestra, por lo que la IgM es capaz de reaccionar con el antígeno inmovilizado. Durante la incubación de la muestra, todos los anticuerpos relacionados con el antígeno de la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. Debe lavarse la placa para eliminar los anticuerpos no fijados y otros componentes del suero.
2. Debe añadirse a los pocillos un anticuerpo de cabra frente a IgM humana, conjugado con peroxidasa (específico para la cadena μ), y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con los anticuerpos del tipo IgM inmovilizados durante la fase sólida, en la 1ª etapa. Deben lavarse los pocillos para eliminar el conjugado no fijado.
3. Los micropocillos que contengan conjugado de peroxidasa inmovilizado deben incubarse con una solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato mediante la peroxidasa da lugar a un cambio de color. Transcurrido cierto tiempo, se detiene la reacción y se determina la intensidad del color de la solución por fotometría. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra para análisis.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE ANÁLISIS

Materiales proporcionados:

Cada sistema de análisis contiene una cantidad suficiente de los siguientes componentes para efectuar la cantidad de análisis indicada en la etiqueta del envase. **NOTA: Los siguientes componentes contienen azida sódica como conservante en una concentración < 0,1 % (m/v): controles, calibrador, solución absorbente y diluyente de la muestra.**

PLATE	1. Placa: 96 pocillos dispuestos en doce tiras de 1 × 8 pocillos, recubiertos del antígeno de <i>B. burgdorferi</i> (cepa B31) inactivado. Las tiras se envían en un soporte para tiras dentro de un sobre con secante.
CONJ	2. Conjugado: anticuerpo de cabra frente a IgM humana, conjugado (peroxidasa de rábano). Frasco de 15 ml con el tapón blanco. Listo para usar.
CONTROL +	3. Control positivo (suero humano): frasco de 0,35 ml con el tapón rojo.
CAL	4. Calibrador (suero humano): frasco de 0,5 ml con el tapón azul.
CONTROL -	5. Control negativo (suero humano): un frasco de 0,35 ml con el tapón verde.
SOLN ABS	6. Solución absorbente: un frasco de 15 ml que contiene anticuerpo de cabra frente a IgG humana (específico para la cadena γ) y una solución salina amortiguada con fosfato. Listo para usar.
DIL SPE	7. Diluyente de la muestra: frasco de 30 ml con el tapón verde, que contiene Tween 20, albúmina de suero bovino y solución salina amortiguada con fosfato. Solución de color verde. Listo para usar.
SOLN TMB	8. TMB: frasco de color topacio de 15 ml con el tapón de color topacio, que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar.
SOLN STOP	9. Solución de detención: frasco de 15 ml con el tapón rojo que contiene H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar.
WASHBUF 10X	10. Solución amortiguadora de lavado (10X): diluya 1 parte de la solución + 9 partes de agua desionizada o destilada. Frasco de 100 ml con tapón transparente que contiene una solución salina amortiguada con fosfato en una concentración de 10X y una solución Tween 20 (solución de color azul). NOTA: El pH de la solución 1X será de 7,2 ± 0,2.

NOTAS:

- Los siguientes componentes son independientes del número de lote del sistema de análisis y pueden intercambiarse con los del sistema de análisis ZEUS ELISA: TMB, solución de detención y solución amortiguadora de lavado.
- El sistema de análisis está equipado con una etiqueta que contiene información específica sobre el lote; esta se encuentra dentro de la caja del sistema de análisis.

PRECAUCIONES

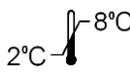
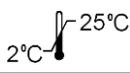
- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Siga las precauciones normales empleadas al manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con agua abundante y busque atención médica. Lleve ropa protectora adecuada, guantes y protección ocular o para la cara. No respire los vapores. Elimine los desechos de acuerdo con la legislación local, estatal y federal aplicable.
- Los pocillos de la placa para ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, debe considerarse que las tiras son **materiales con posible riesgo biológico**, por lo que deben manipularse como tales.
- Los controles son **materiales con posible riesgo biológico**. Los materiales de los que se derivan estos productos dieron un resultado negativo para el antígeno del VIH-1, HBsAg y para los anticuerpos frente al VHC y al VIH mediante métodos de análisis aprobados. No obstante, puesto que ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de ausencia de agentes infecciosos, estos productos deben manipularse de acuerdo con un nivel de bioseguridad 2, según lo recomendado para cualquier muestra de suero o sangre de origen humano potencialmente infecciosa en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", de los Centros para el Control de las Enfermedades y los Institutos Nacionales de Salud (edición actual), y la norma de la OSHA para patógenos transmitidos por la sangre (16).
- Para obtener resultados precisos, es esencial que se ajuste a las condiciones de tiempo y temperatura de incubación especificadas. **Se debe dejar que todos los reactivos se estabilicen a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de iniciar el análisis.** Devuelva los reactivos sin usar a un lugar con la temperatura de refrigeración inmediatamente después de usarlos.
- Un lavado inadecuado puede dar lugar a resultados falsos positivos o falsos negativos. Asegúrese de reducir al mínimo la cantidad residual de la solución de lavado (p. ej., mediante secado o aspirado) antes de añadir el conjugado o sustrato. No deje que los pocillos se sequen entre incubaciones.
- El diluyente de la muestra, los controles, el calibrador y la solución absorbente contienen azida sódica en una concentración < 0,1 % (m/v). Se ha indicado que la azida sódica genera azida de plomo o cobre en las tuberías del laboratorio, que podrían explotar al golpearlas con un martillo. Para evitar este riesgo, aclare bien el lavado con agua tras eliminar la solución que contenga azida sódica.
- La solución de detención resulta TÓXICA si se inhala, se traga o entra en contacto con la piel. Además, puede provocar quemaduras. Si tuviera un accidente o se sintiera indispuesto, busque atención médica de inmediato.
- La solución de TMB es NOCIVA. Resulta irritante para los ojos, el aparato respiratorio y la piel.
- La solución amortiguadora de lavado es IRRITANTE. Resulta irritante para los ojos, el aparato respiratorio y la piel.
- Limpie el fondo de la placa, de modo que quede exenta de líquidos residuales y huellas, ya que estos pueden alterar la lectura de la densidad óptica (DO).
- La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
- No utilice reactivos procedentes de otras fuentes o fabricantes.
- Durante su uso, la solución de TMB debe ser incolora o presentar un tono amarillo, verde o azul muy claros. Si el TMB se contamina con el conjugado u otros oxidantes, la solución cambiará de color de forma prematura. No utilice el TMB si presenta un color azul evidente.
- No pipeteo nunca con la boca. Evite el contacto de los reactivos y de las muestras de los pacientes con la piel y las mucosas.
- Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Se pueden obtener resultados incorrectos.
- La contaminación cruzada de los reactivos y/o de las muestras podría provocar resultados erróneos.
- Los utensilios de vidrio reutilizables se deben lavar bien sin usar detergentes.
- Evite las salpicaduras o la generación de aerosoles.
- No exponga los reactivos a una luz potente durante su conservación o incubación.
- Deje que el soporte y las tiras de micropocillos alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos. La cubierta de protección evitará la condensación en los pocillos.
- Recoja la solución de lavado en un recipiente de desecho. Trate la solución residual con desinfectante (es decir, lejía de uso doméstico al 10 % o hipoclorito sódico al 0,5 %). Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
- Atención: Neutralice cualquier solución residual con un pH ácido antes de añadirla a la solución de lejía.
- No utilice la placa para ELISA si la tira indicadora de la bolsa de secante ha pasado de ser de color azul a ser de color rosa.
- No deje que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que puedan haber contenido previamente una solución que utilice la azida sódica como conservante. Las cantidades residuales de azida sódica pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
- No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía ni a ningún olor fuerte procedente de soluciones que contengan lejía. Cualquier resto de lejía (hipoclorito sódico) puede destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos del sistema de análisis.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Evaluador de micropocillos para ELISA, capaz de evaluar de acuerdo con una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Puede usarse un evaluador de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible una longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**

- Pipetas de precisión con una capacidad de 10 - 200 µl.
- Pipetas multicanal de precisión con una capacidad de 50 - 200 µl.
- Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
- Piseta o sistema de lavado de micropocillos.
- Agua destilada o desionizada.
- Probeta graduada de 1 litro.
- Pipetas serológicas.
- Puntas de pipeta desechables.
- Papel absorbente.
- Temporizador de laboratorio para controlar la incubación.
- Recipiente de desechos y desinfectante (es decir: lejía doméstica al 10 % o hipoclorito sódico al 0,5 %).

CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

	Tiras de micropocillos recubiertos: Vuelva a sellar las tiras adicionales con secante y almacénelas correctamente. Una vez abiertas, las tiras se mantienen estables durante 60 días y pueden usarse siempre que la tira indicadora de la bolsa de secante sea de color azul.
	Conjugado: NO CONGELAR.
	Sistema de análisis, calibrador, control positivo, control negativo, TMB, diluyente de la muestra y solución absorbente sin abrir.
	Solución de detención: 2 - 25 °C.
	Solución amortiguadora de lavado (1X): 20 - 25 °C durante siete días y 2 - 8 °C durante 30 días. Solución amortiguadora de lavado (10X): 2 - 25 °C.

RECOGIDA DE MUESTRAS

- ZEUS Scientific recomienda que el usuario recoja las muestras de acuerdo con el documento M29 de la CLSI, Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (edición actual).
- Ningún método de análisis conocido ofrece una garantía total de que las muestras de sangre humana no transmitan infecciones. Por tanto, considere que todos los hemoderivados son potencialmente infecciosos.
- Para este análisis, utilice solamente suero recién extraído y refrigerado de forma adecuada, obtenido mediante procedimientos de venopunción aprobados (6, 7). No lo utilice si contiene anticoagulantes o conservantes añadidos. Evite el uso de sueros hemolizados, lipémicos o bacteriológicamente contaminados. Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un máximo de 8 horas. Si el análisis no se realiza en un plazo de 8 horas, el suero puede conservarse a entre 2-8 °C, durante un máximo de diez días. Si se espera un retraso en la realización del ensayo, conserve el suero a analizar a -20 °C o a una temperatura inferior. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación, que podrían provocar la pérdida de actividad de los anticuerpos y arrojar resultados erróneos. Es responsabilidad de cada laboratorio utilizar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para dicho laboratorio (16).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

- Extraiga los componentes del lugar de conservación y deje que se estabilicen a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine la cantidad de micropocillos necesarios. Reserve seis espacios para control/calibrado (un blanco de reactivos, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por desarrollo y un blanco de reactivos por cada análisis. Revise los requisitos del software y el evaluador para conocer la configuración correcta de los controles/calibradores. Guarde las tiras que no haya utilizado en la bolsa de cierre hermético que contiene el secante, ciérrela y almacénela a una temperatura entre 2 y 8 °C.

EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA		
	1	2
A	Blanco	Paciente 3
B	Control negativo	Paciente 4
C	Calibrador	Etc.
D	Calibrador	
E	Calibrador	
F	Control positivo	
G	Paciente 1	
H	Paciente 2	

- Prepare una dilución 1:21 (p. ej., 10 µl de suero + 200 µl del diluyente de la muestra) que contenga el control negativo, el calibrador, el control positivo y el suero de cada paciente. Asegúrese de que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta distinta para cada muestra.
- Pipetee 100 µl de la solución absorbente en los pocillos que corresponda de una placa de dilución en blanco. Utilice una pipeta multicanal para transferir 50 µl de cada muestra diluida y suero de control a la placa de dilución que contenga la solución absorbente. Recoja y suelte las muestras varias veces para asegurarse de que se mezclen correctamente.
- Pipetee 100 µl de cada control, calibrador y muestra diluidos de la placa de absorción en la placa para análisis. Asegúrese de que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta distinta para cada muestra.
- Pipetee 100 µl del diluyente de la muestra en el pocillo A1, a modo de blanco de reactivos. Revise los requisitos del software y el evaluador para conocer la configuración correcta del blanco de reactivos.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 minutos.
- Lave las tiras de micropocillos cinco veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite enérgicamente los pocillos hasta que no quede líquido.
 - Llene los micropocillos de la solución amortiguadora de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire en los pocillos.
 - Repita los pasos 1 y 2 cinco veces.
 - Extraiga la solución de lavado de todos los pocillos. Dé la vuelta a la placa, colóquela sobre papel absorbente y golpéela suavemente para eliminar cualquier resto de solución de lavado de los pocillos. Revise la placa de forma visual para asegurarse de que no queden restos de la solución de lavado. Vierta toda la solución de lavado en un recipiente de desechos y trátela con desinfectante al final del día.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si va a utilizar un sistema de lavado automático de micropocillos, ajuste el volumen de dispensación a 300 - 350 µl/pocillo. Programe cinco ciclos de lavado sin pausa entre lavados. Si es necesario, extraiga la placa de micropocillos de la lavadora, colóquela del revés sobre papel absorbente y golpéela suavemente para extraer cualquier resto de la solución de lavado de los micropocillos.
- Pipetee 100 µl del conjugado en cada pocillo, incluido el pocillo del blanco de reactivos, a la misma velocidad y en el mismo orden que las muestras.
- Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 minutos.
- Lave los micropocillos de acuerdo con el procedimiento que se indica en el apartado 8.
- Pipetee 100 µl del TMB en cada pocillo, incluido el pocillo del blanco de reactivos, a la misma velocidad y en el mismo orden que las muestras.

13. Incube la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 10 - 15 minutos.
14. Detenga la reacción pipeteando 50 µl de la solución de detención en cada pocillo, incluido el pocillo del blanco de reactivos, a la misma velocidad y en el mismo orden que el TMB. Las muestras positivas pasarán de ser de color azul a ser de color amarillo. Tras pipetear la solución de detención, golpee la placa suavemente varias veces para asegurarse de que las muestras se mezclen bien.
15. Configure el evaluador de micropocillos para que evalúe de acuerdo con una longitud de ondas de 450 nm y determine la densidad óptica (DO) de cada pocillo frente al blanco de reactivos. Evalúe la placa menos de 30 minutos después de añadir la solución de detención.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Diluya el suero en 1:21.
2. Mezcle 50 µl del suero diluido y 100 µl de la solución absorbente.
3. Pipetee el suero diluido en el micropocillo: 100 µl/pocillo.
4. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 25 ± 5 minutos.
5. Lave.
6. Pipetee el conjugado: 100 µl/pocillo.
7. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 25 ± 5 minutos.
8. Lave.
9. Pipetee el TMB: 100 µl/pocillo.
10. $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ Incube durante 10 ± 15 minutos.
11. Pipetee la solución de detención: 50 µl/pocillo. Mezcle.
12. EVALÚE en un plazo de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

1. Cada vez que se realice un análisis, debe introducirse tres veces el calibrador. También debe incluirse un blanco de reactivos, un control negativo y un control positivo.
2. Calcule la media de los tres pocillos del calibrador. Si alguno de los tres valores se desvía más de un 15 % de la media, elimine dicho valor y calcule la media usando los dos pocillos restantes.
3. El valor medio de la DO del calibrador, el control positivo y el control negativo debe ajustarse a los siguientes intervalos:

	<u>Intervalo de la DO</u>
Control negativo	≤ 0,250
Calibrador	≥ 0,300
Control positivo	≥ 0,500

 - a. La DO del control negativo dividida entre la media de la DO del calibrador debe ser ≤ 0,9.
 - b. La DO del control positivo dividida entre la media de la DO del calibrador debe ser ≥ 1,25.
 - c. Si no se reúnen las condiciones antedichas, debe considerarse que el análisis no es válido, por lo que debe repetirse.
4. El objetivo del control positivo y el control negativo es controlar que no se cometa un error importante con los reactivos. No obstante, estos no garantizan la precisión del valor de corte del análisis.
5. Pueden analizarse controles adicionales de acuerdo con las directrices o requisitos de la normativa local, estatal o federal o las organizaciones de acreditación.
6. Consulte el documento C24 de la CLSI, Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures, para saber más sobre las prácticas óptimas de CC.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. **Cálculos:**
 - a. *Factor de corrección:* El fabricante ha determinado un valor de corte de la DO para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite determinar el valor de corte para las muestras positivas. Además, corrige la variabilidad cotidiana leve de los resultados de los análisis. Se determina un factor de corrección para cada lote de componentes; este aparece en la etiqueta del componente, que se encuentra en la caja del sistema de análisis.
 - b. *Valor de corte de la DO:* Para obtener el valor de corte de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador, que ya debe haber determinado.
(FC × media de la DO del calibrador = valor de corte de la DO)
 - c. *Cociente valor índice/DO:* Calcule el cociente valor índice/DO de cada muestra dividiendo el valor de la DO entre el valor de corte de la DO, determinado en el apartado b.

Ejemplo:	Media de la DO del calibrador	=	0,793
	Factor de corrección (FC)	=	0,25
	Valor de corte de la DO	=	0,793 × 0,25 = 0,198
	DO de muestra desconocida	=	0,432
	Cociente valor índice/DO de la muestra	=	0,432/0,198 = 2,18

2. **Interpretación:** Los cocientes valor índice/DO se interpretan del siguiente modo.

	<u>Cociente valor índice/DO</u>
Muestras negativas	≤ 0,90
Muestras dudosas	0,91 - 1,09
Muestras positivas	≥ 1,10

- a. *Negativas:* anticuerpos del tipo IgM no detectables; el resultado no descarta la infección por *B. burgdorferi*. Si hay motivos para sospechar de infección inicial, debe analizarse una nueva muestra de cuatro a seis semanas después (8).
- b. *Dudosas:* de acuerdo con las recomendaciones actuales, si los resultados son dudosos, deben realizarse análisis complementarios por inmunolectrotransferencia. Los análisis por inmunolectrotransferencia sobre *B. burgdorferi* son complementarios más que confirmatorios, pues su especificidad no es óptima, en particular para la detección de IgM. Un resultado dudoso debe notificarse junto con los resultados de los análisis por inmunolectrotransferencia. No notifique los resultados hasta que se hayan completado los análisis complementarios.
- c. *Positivas:* anticuerpos del tipo IgM frente a *B. burgdorferi* detectados. De acuerdo con las recomendaciones actuales, este resultado no puede seguir interpretándose sin un análisis por inmunolectrotransferencia. Los análisis por inmunolectrotransferencia sobre *B. burgdorferi* son complementarios más que confirmatorios, pues su especificidad no es óptima, en particular para la detección de IgM. No notifique los resultados hasta que se hayan completado los análisis complementarios.

3. **Uso e interpretación de MACM (2-EIA) para la detección de anticuerpos del tipo IgM:**

Además de usarse para los inmunoanálisis iniciales en el método de análisis confirmatorio estándar (MACE), este dispositivo puede usarse para los análisis confirmatorios del protocolo 2-EIA o el método de análisis confirmatorio modificado (MACM) del siguiente modo.

- a. Las muestras deben analizarse, en primer lugar, con el sistema de análisis de IgG/IgM para VisE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA.
- b. A continuación, deben analizarse todas las muestras positivas y dudosas con el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA.
- c. Los resultados positivos y dudosos de los análisis confirmatorios mediante EIA deben considerarse positivos e interpretarse como análisis complementario de la presencia de anticuerpos del tipo IgM y de exposición a *B. burgdorferi*.

LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Para realizar el estudio mediante MACM, se utilizó el sistema de análisis de IgG/IgM para VlsE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA como análisis inicial y el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* como análisis confirmatorio; los análisis se realizaron en dicho orden. No se ha establecido la eficacia diagnóstica del dispositivo en caso de modificación del orden del análisis o de sustitución por otros análisis mediante EIA en el MACM (2-EIA).
- Es posible que el suero procedente de pacientes con otras enfermedades por espiroquetas (sífilis, pian, pinta, leptospirosis y borreliosis) o mononucleosis infecciosa arroje resultados falsos positivos (9, 10). Si se observaran reacciones por falsos positivos, deberán llevarse a cabo análisis clínicos epidemiológicos adicionales, a fin de elaborar el diagnóstico correcto. Para identificar resultados falsos positivos procedentes de sueros de pacientes con sífilis, haga un análisis de la RPR y de anticuerpos frente a *Treponema* para tratar de detectar anticuerpos frente a la sífilis (11). El resultado de estos análisis será negativo si el suero es positivo para *B. burgdorferi*.
- Podrán obtenerse resultados falsos negativos si las muestras de suero se extraen demasiado pronto tras la aparición de la enfermedad, antes de que los valores de los anticuerpos alcancen niveles significativos (12). También es posible que el tratamiento antibiótico precoz elimine la respuesta de los anticuerpos frente a las espiroquetas (13).
- Todos estos datos deben interpretarse junto con los síntomas clínicos de la enfermedad, los datos epidemiológicos, la exposición en zonas endémicas y los resultados de otras analíticas.
- El factor reumatoide puede generar falsos positivos.
- No haga exámenes colectivos de la población general. El valor diagnóstico de un resultado positivo depende de la probabilidad de infección previa al análisis. Haga los análisis solo si se observan síntomas clínicos o si es posible que haya habido cierta exposición.
- No se ha establecido la eficacia diagnóstica del sistema de análisis de IgM frente a *B. burgdorferi* ZEUS ELISA con muestras derivadas de personas vacunadas con antígenos de *B. burgdorferi*.

RESULTADOS PREVISTOS

Solo de un 10 % a un 40 % de los pacientes con EM presentan valores detectables de anticuerpos frente a *B. burgdorferi* (3, 12 y 14). El valor máximo de la respuesta a la IgM suele observarse de tres a seis semanas después de la infección, que no suele ser detectable durante las primeras dos semanas. No suele detectarse respuesta a los anticuerpos del tipo IgG durante un período comprendido entre cuatro y seis semanas después de la infección. Para contar con un panorama serológico más completo, deben analizarse sueros agudos y de convalecientes. La mayor parte de los pacientes (94 - 97 %) con complicaciones neurológicas y prácticamente todos los pacientes con artritis presentan valores elevados de IgG frente a las espiroquetas (14, 15). En las etapas tardías, los análisis positivos para anticuerpos pueden ayudar a distinguir la borreliosis de las meningitis víricas o las parálisis sin causa aparente. Los análisis positivos para anticuerpos resultan especialmente útiles a la hora de diferenciar la artritis por enfermedad de Lyme de la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil y el síndrome de Reiter (13). Los pacientes que no presentan ni los signos ni el cuadro clínico característicos de la borreliosis deberían dar negativo en los análisis realizados con el sistema de análisis de IgM frente a *B. burgdorferi* ZEUS ELISA.

EFICACIA DIAGNÓSTICA

1. Estudio comparativo

Se comparó el sistema de análisis de IgM frente a *B. burgdorferi* ZEUS ELISA con un ensayo ELISA de detección de anticuerpos del tipo IgM frente a *B. burgdorferi*. Se analizaron 210 muestras de suero mediante ambos procedimientos. Los resultados de los análisis aparecen en la tabla 1.

Tabla 1: Resumen de los resultados de los análisis comparativos

IgM frente a <i>B. burgdorferi</i> de ZEUS ELISA		ELISA: referencia		
		Positivo	Negativo	Dudoso*
	Positivo	42	11	2
	Negativo	2	136	4
	Dudoso*	3	8	2

Sensibilidad relativa= 95,5 % (42/44)

Especificidad relativa = 92,5 % (136/147)

Concordancia = 93,1 % (178/191)

*Se excluyeron del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y la concordancia todos los resultados dudosos.

Se realizó un segundo estudio en el laboratorio de inmunología clínica de una facultad de medicina. Se analizaron 21 muestras de suero de pacientes con enfermedad de Lyme aguda o de convalecientes mediante el ensayo ELISA de IgM. Caracterizó las muestras de suero de los pacientes una autoridad reconocida. Los sueros procedentes de la fase aguda (estadio I) pertenecían a pacientes con el típico EM. Los sueros de convalecientes presentaban los síntomas típicos de la enfermedad de Lyme de estadios II y III. En este estudio, los sueros también se analizaron a través de cinco ensayos ELISA específicos para IgG/IgM e IgG frente a *Borrelia burgdorferi*. La tabla 2 recoge los resultados de los seis ensayos ELISA:

Tabla 2: Resumen de los análisis de sueros de pacientes con la enfermedad de Lyme

Ensayo ELISA para:		IgG/IgM				IgG	IgM
Número de la muestra	Estadio de la enfermedad	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Análisis 4	Análisis 5	Análisis 6
1	1	+	+	+	+	-	+
2	1	+	+	+	+	-	+
3	1	-	-	-	-	-	-
4	1	-	-	-	+	-	+
5	1	-	-	-	-	-	-
6	1	+	+	+	+	+	+
7	1	+	+	+	+	+	+
8	2	+	+	+	+	+	+
9	2	+	+	+	±	+	-
10	2	+	+	+	+	+	+
11	2	+	+	-	+	+	±
12	2	+	+	+	+	+	+
13	2	+	+	+	+	+	+
14	2	+	+	+	+	+	-
15	3	+	+	+	+	+	+
16	3	+	+	+	+	+	-
17	3	+	+	+	+	+	-
18	3	+	+	+	±	+	-
19	3	+	+	+	+	+	-
20	3	+	+	+	+	+	+
21	3	+	+	+	+	+	-

La tabla 3 recoge los resultados analíticos obtenidos usando un conjunto de sueros de los CDC. El objetivo de la presentación de estos resultados es ofrecer información adicional sobre la eficacia del análisis con un grupo de sueros caracterizado y enmascarado. Esto no significa que los CDC respalden este análisis.

Tabla 3: Grupo de sueros con *B. burgdorferi* de los CDC estratificado por tiempo desde la aparición

Tiempo desde la aparición	Positivo	Dudoso	Negativo	Total	Concordancia con el diagnóstico clínico
Valor de referencia	0	0	5	5	100 %
< 1 mes	3	0	2	5	60 %
1 - 2 meses	7	0	2	9	78 %
3 - 12 meses	5	0	15	20	25 %
> 1 año	1	0	7	8	12 %
Total	16	0	31	47	45 %

2. Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del sistema de análisis, se analizaron seis muestras de suero durante tres días consecutivos. Cada día se analizaron ocho duplicados de cada muestra de suero. Se calculó la media del cociente de la DO y el coeficiente de variabilidad (CV) de cada muestra. La tabla 4 recoge dichos datos.

Tabla 4: Resumen de los análisis de reproducibilidad

Muestra	Intranalítica (n = 8)						Interanalítica (n = 3)	
	Día 1		Día 2		Día 3		Cociente medio	CV (%)
	Cociente medio	CV (%)	Cociente medio	CV (%)	Cociente medio	CV (%)		
1	1,63	3	1,69	4	1,43	6	1,60	6
2	1,72	7	1,80	6	1,53	9	1,68	7
3	1,33	8	1,42	5	1,21	5	1,32	7
4	1,07	3	1,29	4	1,02	6	1,13	10
5	0,85	7	0,99	5	0,89	7	0,91	6
6	0,21	11	0,26	14	0,22	5	0,24	13

3. Eficacia diagnóstica del MACM (2-EIA)

Se llevaron a cabo los siguientes estudios con el fin de determinar la eficacia diagnóstica del sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA como análisis confirmatorio del método de análisis confirmatorio modificado (MACM) o el protocolo 2-EIA.

- a. **Comparación del método MACM-IgM:** se utilizó el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA como análisis confirmatorio en un protocolo MACM, según se indica en el siguiente diagrama de flujo. El sistema de EIA que se usó para el análisis inicial fue el sistema de análisis de IgG/IgM para VlsE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA. Se evaluó la eficacia del MACM-IgM frente a la del MACE por medio de dos cohortes independientes: una cohorte retrospectiva y una cohorte prospectiva.

Diagrama de flujo: protocolo del MACM-IgM



- b. **Análisis de la cohorte retrospectiva:** La cohorte retrospectiva, conformada por 356 muestras, estuvo compuesta por las 280 muestras del grupo de muestras de los CDC, que se completaron con 46 muestras adicionales de enfermedad de Lyme (EL) de estadio II y 30 muestras adicionales de EL de estadio III. Por lo tanto, el grupo retrospectivo estuvo compuesto por 166 muestras de EL (60 de estadio I, 56 de estadio II y 50 de estadio III), 90 muestras de enfermedades distintas de la EL y 100 muestras de voluntarios sanos (50 endémicas y 50 no endémicas).

Para empezar, se analizaron las 356 muestras retrospectivas con el sistema de análisis inicial, el sistema de análisis de IgG/IgM para VlsE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA. Hubo 160 resultados positivos y 6 resultados dudosos. De acuerdo con el protocolo MACE, las muestras que arrojaron resultados positivos y dudosos (n = 166) se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia de IgM frente a *B. burgdorferi*. De acuerdo con el protocolo MACM-IgM, estas muestras (n = 166) se analizaron usando un EIA confirmatorio: el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA. Se consideró que los resultados tanto dudosos como positivos del EIA confirmatorio eran positivos. Se sumaron los resultados dudosos a los positivos y se comparó el resultado con los resultados positivos del protocolo MACE. La tabla 5 recoge los resultados del protocolo MACM-IgM frente a los del MACE-IgM.

Tabla 5: Comparación de los resultados de los protocolos MACM-IgM y MACE-IgM correspondientes a la cohorte retrospectiva

	Estadio I (n = 60)		Estadio II (n = 56)		Estadio III (n = 50)		Voluntarios sanos (n = 100)		Voluntarios enfermos (n = 90)	
	MACE-IgM	MACM-IgM	MACE-IgM	MACM-IgM	MACE-IgM	MACM-IgM	MACE-IgM	MACM-IgM	MACE-IgM	MACM-IgM
Positivo	28	46	28	42	8	36	0	0	0	2
Negativo	32	14	28	14	42	14	100	100	90	88
Sensibilidad o VPP	46,7 %	76,7 %	50,0 %	75,0 %	16,0 %	72,0 %	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.
Especificidad o VPN	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.	N. P.	100 %	100 %	100 %	97,8 %

- c. **Análisis de la cohorte prospectiva:** Se utilizó una cohorte prospectiva de muestras de suero, que se envió a un laboratorio para que se realizara un análisis serológico de *Borrelia*. Dichas muestras se recogieron en tres localizaciones distintas de los EE. UU., todas ellas situadas en zonas endémicas para la EL. Dos de las tres localizaciones (Massachusetts y Minnesota) recogieron las muestras y realizaron los análisis correspondientes mediante ELISA. Una de las localizaciones (Wisconsin) recogió las muestras y las envió al fabricante para que este realizara los análisis correspondientes mediante ELISA. La tabla 6 indica cuáles son las tres localizaciones y el número correspondiente de muestras.

Tabla 6: Resumen de la cohorte prospectiva de muestras

Localización geográfica	Tamaño de la muestra (n)
Massachusetts	900
Wisconsin	990
Minnesota	1042
Total	2932

Para empezar, se analizaron las 2932 muestras prospectivas con el sistema de análisis inicial, el sistema de análisis de IgG/IgM para VlsE1/pepC10 frente a *Borrelia* ZEUS ELISA. Hubo 363 resultados positivos y 58 resultados dudosos. De acuerdo con el protocolo MACE, las muestras que arrojaron resultados positivos y dudosos (n = 421) se analizaron mediante inmunoelectrotransferencia de IgM frente a *B. burgdorferi*. De acuerdo con el protocolo MACC-IgM, estas muestras (n = 421) se analizaron usando un análisis ELISA confirmatorio: el sistema de análisis de IgM frente a *Borrelia burgdorferi* ZEUS ELISA. Se consideró que los resultados tanto dudosos como positivos del EIA confirmatorio eran positivos. Se sumaron los resultados dudosos a los positivos y se comparó el resultado con los resultados positivos del protocolo MACE. La tabla 7 recoge un resumen de los resultados del MACE frente a los del MACM-IgM:

Tabla 7: MACE-IgM frente a MACM-IgM en la cohorte prospectiva

MACM-IgM	MACE-IgM		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	101	126**	227
Negativo	4*	2701	2705
Total	105	2872	2932

Concordancia positiva: 96,2 % (101/105) IC del 95 %: 90,6 - 98,5 %

Concordancia negativa: 95,5 % (2701/2827) IC del 95 %: 94,7 - 96,2 %

*De las cuatro muestras positivas para el MACE-IgM y negativas para el MACM-IgM, tres no presentaron información clínica congruente con la enfermedad de Lyme y una no presentó información clínica.

**De las 126 muestras positivas para el MACM-M y negativas para el MACE-M, 28 no presentaron información clínica congruente con la enfermedad de Lyme, dos presentaron signos clínicos de infección previa, cinco presentaron datos clínicos congruentes con la EL de estadio I y 91 no presentaron información clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, and Spielman A: Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J. Infect. Dis.* 154:295-300, 1986.
2. Rosenfeld MEA: Serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 31:3090-3095, 1993.
3. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, and Marawista SE: The spirochetal etiology of Lyme disease. *New Engl. J. Med.* 308:733, 1983.
4. Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, and Schell RF: Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 patients in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *J. Clin. Microbiol.* 35:537-543, 1997.
5. U.S. Department of Labor (OSHA): Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. 21CFR 1910.1030.
6. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: NCCLS Procedure H18. Approved guideline.
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: NCCLS Procedure H3, Approved Standard.
8. Barbour A: Laboratory Aspects of Lyme Borreliosis. *Clin Micr. Rev.* 1:399-414, 1988.
9. Russel H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, and Plikaytis B: Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 149:465, 1984.
10. Magnarelli LA, Anderson JF, and Johnson RC: Cross-reactivity in serological test for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect. Dis.* 156:183-188, 1987.
11. Hunter EF, Russell H, et al: Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponeme antibody-absorption test for syphilis. *Sex. Trans. Dis.* 13:236, 1986.
12. Shrestha M, Grodzicki RL, and Steere AC: Diagnosing early Lyme disease. *Am. J. Med.* 78:235, 1985.
13. Steere AC, Hutchinson GJ, Rahn DW, Sigal LH, Craft JE, DeSanna ET, and Malawist SE: Treatment of the early manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* 99:22, 1983.
14. Craft JE, Grodzicki RL, Shrestha M, Fischer DK, Garcia-Bianco M, and Steer AC: Antibody response in Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* 57:561, 1984.
15. Reik L, Smith L, Khan A, and Nelson W: Demyelinating encephalopathy in Lyme disease. *Neurology* 35:267, 1985.
16. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.
17. Branda JA, et al. Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease With Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay. *Clin Infect Dis* 2011; 53:541-547.
18. Mollins CR, et al. Lyme Boreliosis Serology: Performance of Several Commonly Used Laboratory Diagnostic Tests and a Large Resource Panel of Well Characterized Patient Specimens. *J Clin Microbiol* 2016; 54:2726-2734.
19. Branda JA, et al. Advances in Serodiagnostic Testing for Lyme Disease Are at Hand. *Clin Infect Dis* 2018 Mar 19;66(7):1133-1139



ZEUS Scientific, Inc.

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, EE. UU.

Número gratuito (EE. UU.): 1-800-286-2111, Opción 2

Internacional: +1 908-526-3744

Fax: +1 908-526-2058

Sitio web: www.zeusscientific.com

ZEUS ELISA y SAVE Diluent[®] son marcas comerciales de ZEUS Scientific, Inc.

Sistema de análisis de IgM frente a *B. burgdorferi* ZEUS ELISA

Para el Servicio de Atención al Cliente en EE. UU., póngase en contacto con su distribuidor local.

Para el Soporte Técnico en EE. UU., póngase en contacto con ZEUS Scientific, llamando al número gratuito o enviando un correo electrónico a support@zeusscientific.com.

Para consultas al Servicio de Atención al Cliente y al Soporte Técnico en otros países, póngase en contacto con su distribuidor local.

© 2022 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.



EMERGO EUROPE
Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague
The Netherlands

(Fecha rev. 01/11/2022)