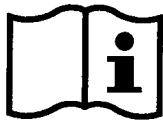


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Borrelia burgdorferi IgM ELISA

Enzyme immunoassay for the detection and quantitative determination of human IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi* in serum and plasma



DEBOR03



96 wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS

1. INTENDED USE.....	3
2. GENERAL INFORMATION	3
3. PRINCIPLE OF THE TESTS.....	3
4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS.....	4
5. REAGENTS PROVIDED	4
6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED	5
7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING	6
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. EVALUATION.....	7
10. ASSAY CHARACTERISTICS	7
11. REFERENCES	8
1. VERWENDUNGSZWECK.....	9
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	9
3. TESTPRINZIP	9
4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
5. INHALT DES TESTBESTECKS.....	10
6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL.....	11
7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN.....	12
8. TESTDURCHFÜHRUNG	12
9. AUSWERTUNG.....	13
10. TESTCHARAKTERISTIKA.....	13
11. LITERATUR.....	14
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	16

1. INTENDED USE

The Borrelia burgdorferi IgM antibody ELISA kit has been designed for the detection and the quantitative determination of specific IgM antibodies against Borrelia burgdorferi in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be requested from the Technical Service of DEMEDITEC.

Laboratory results can never be the only base of a medical report. The patient history and further tests have additionally to be taken into account.

2. GENERAL INFORMATION

Borrelia burgdorferi belongs to the family of spirochetes, of which three types have been identified to be human pathogenic: Borrelia burgdorferi sensu stricto, B. afzelii and B. garinii. The endemic areas of Borrelia are in Central and Eastern Europe, as well as Russia, China and Japan. The illness is transferred via tick bites, in Europe mainly by Ixodes ricinus. In the endemic zones, like Southern Germany and Austria, up to 50 % of the ticks are infected.

In the clinical course, after an erythema migrans, e.g. with neuroborreliosis, which appears at the first stage, also chronic arthritis, encephalitis, meningitis, myositis and hepatitis are observed. Treatment is done via different antibiotics, e.g. doxycyclin, amoxicillin, cefuroxim and penicillin G. A specific immunization is possible with immunoprophylaxis either by a recombinant OspA or by a recombinant polyvalent OspC vaccine.

The laboratory diagnosis is performed by the detection of antibodies in blood and cerebrospinal fluid. Methods employed are: ELISA, immunofluorescence, hemagglutination or Western blot. Besides whole cell extracts, recently there are increasingly used purified or recombinant single proteins as antigens. This brings however generally a decrease in sensitivity. It could be shown that between the various test methods there appear significant differences in the interpretation, so that the most reliable method seems to be the follow-up of the titer development. Western blot serves as a confirmatory test, because electrophoretically separated single antigens can be evaluated in their reaction with specific serum antibodies.

The Borrelia burgdorferi IgM ELISA test kit contains besides a whole cell antigen extract of Borrelia burgdorferi sensu stricto, which cross-reacts with Borrelia afzelii and Borrelia garinii, an addition of pure OspC, which increases the specificity and sensitivity of the assay. If the test shows only a positive IgG result (IgM negative), the immunity of the patient can be concluded. As mentioned above, in the case of a clearly positive clinical finding, there should be performed a confirmation of the titer increase with the same assay. With a positive IgM at the same time, there is a strong suspicion of an active disease.

3. PRINCIPLE OF THE TESTS

The Borrelia burgdorferi IgM antibody test kit is based on the principle of the enzyme immunoassay (EIA). Borrelia burgdorferi antigen is bound on the surface of the microtiter strips. Diluted patient serum or ready-to-use standards are pipetted into the wells of the microtiter plate. A binding between the IgM antibodies of the serum and the immobilized Borrelia burgdorferi antigen takes place. After a one hour incubation at room temperature, the plate is rinsed with diluted wash solution, in order to remove unbound material. Then ready-to-use anti-human-IgM peroxidase conjugate is added and incubated for 30 minutes. After a further washing step, the substrate (TMB) solution is pipetted and incubated for 20 minutes, inducing the development of a blue dye in the wells. The color development is terminated by the addition of a stop solution, which changes the color from blue to yellow. The resulting dye is measured spectrophotometrically at the wavelength of 450 nm. The concentration of IgM antibodies is directly proportional to the intensity of the color.

4. LIMITATIONS, PRECAUTIONS AND GENERAL COMMENTS

- Only for in-vitro use! Do not ingest or swallow! The usual laboratory safety precautions as well as the prohibition of eating, drinking and smoking in the lab have to be followed.
- All sera and plasma or buffers based upon, have been tested respective to HBsAg, HIV and HCV with recognized methods and were found negative. Nevertheless precautions like the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills have to be wiped off with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite, 5%) and have to be disposed of properly.
- All reagents have to be brought to room temperature (18 to 25 °C) before performing the test.
- Before pipetting all reagents should be mixed thoroughly by gentle tilting or swinging. Vigorous shaking with formation of foam should be avoided.
- It is important to pipet with constant intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same conditions.
- When removing reagents out of the bottles, care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Further a possible mix-up has to be avoided. The content of the bottles is usually sensitive to oxidation, so that they should be opened only for a short time.
- In order to avoid a carry-over or a cross-contamination, separate disposable pipet tips have to be used.
- All reagents have to be used within the expiry period.
- In accordance with a Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO9001 all laboratory devices employed should be regularly checked regarding the accuracy and precision. This refers amongst others to microliter pipets and washing or reading (ELISA-Reader) instrumentation.
- The contact of certain reagents, above all the stopping solution and the substrate with skin, eye and mucosa has to be avoided, because possible irritations and acid burns could arise, and there exists a danger of intoxication.

5. REAGENTS PROVIDED

Components	Volume / Qty.
Borrelia burgdorferi antigen coated microtiter strips	12
Calibrator A (Negative Control)	2 mL
Calibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Calibrator C (Weak Positive Control)	2 mL
Calibrator D (Positive Control)	2 mL
Enzyme Conjugate	15 mL
Substrate	15 mL
Stop Solution	15 mL
Sample Diluent	60 mL
Washing Buffer (10×)	60 mL
Plastic bag	1

Storage and Stability (refer to the expiry date on the outer box label)

Store kit components at 2-8°C and do not use after the expiry date on the box outer label. Before use, all components should be allowed to warm up to ambient temperature (18-25°C). After use, the plate should be resealed, the bottle caps replaced and tightened and the kit stored at 2-8°C. After the first opening the kit should be used within 3 months, the diluted wash buffer can be kept for 4 weeks at 2-8°C.

5.1. Mikrotiter Strips

12 strips with 8 breakable wells each, coated with Borrelia burgdorferi antigen (mix of Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Ready-to-use.

5.2. Calibrator A (Negative Control)

2 mL, protein solution diluted with PBS, contains no IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.3. Calibrator B (Cut-Off Standard)

2 mL human serum diluted with PBS, contains a low concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.4. Calibrator C (Weak Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a medium concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.5. Calibrator D (Positive Control)

2 mL, human serum diluted with PBS, contains a high concentration of IgM antibodies against Borrelia burgdorferi. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane. Ready-to-use.

5.6. Enzyme Conjugate

15 mL, anti-human-IgM-HRP (rabbit), in protein-containing buffer solution. Addition of 0.01 % methylisothiazolone and 0.01 % bromonitrodioxane and 5 mg/L ProclinTM. Ready-to-use.

5.7. Substrate

15 mL, TMB (tetramethylbenzidine). Ready-to-use.

5.8. Stop Solution

15 mL, 1 N acidic solution. Ready-to-use.

5.9. Sample Diluent

60 mL, PBS/BSA buffer. Addition of 0.095 % sodium azide. Ready-to-use.

5.10. Washing Buffer

60 mL, PBS + Tween 20, 10x concentrate. Final concentration: dilute 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

5.11. Plastic Bag

Resealable, for the dry storage of non-used strips.

6. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micro- and multichannel pipets
- Microtiter Plate Reader (450 nm)
- Microtiter Plate Washer
- Reagent tubes for the serum dilution
- Deionized water
- Re-usable black lid for covering (Available upon request at Demeditec Diagnostics GmbH)

7. SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Principally serum or plasma (EDTA, heparin) can be used for the determination. Serum is separated from the blood, which is aseptically drawn by venipuncture, after clotting and centrifugation. The serum or plasma samples can be stored refrigerated (2-8 °C) for up to 7 days. For a longer storage they should be kept at -20 °C. The samples should not be frozen and thawed repeatedly. Lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

For the performance of the test the samples (not the standards) have to be diluted 1:101 with ready-to-use sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent).

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Preparation of Reagents

Washing Solution: dilute before use 1+9 with deionized water. If during the cold storage crystals precipitate, the concentrate should be warmed up at 37 °C for 15 minutes.

- Strict adherence to the protocol is advised for reliable performance. Any changes or modifications are the responsibility of the user.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature longer than necessary.
- A standard curve should be established with each assay.
- Return the unused microtiter strips to the plastic bag and store them dry at 2-8 °C.

8.2. Assay Steps

1. Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the standards, controls and samples as well as for a substrate blank.
2. Pipet 100 µL each of the **diluted** (1:101) samples and the **ready-to-use** standards and controls respectively into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
3. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 60 minutes.
4. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
5. Pipet 100 µL each of ready-to-use conjugate into the wells. Leave one well empty for the substrate blank.
6. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 30 minutes.
7. Empty the wells of the plate (dump or aspirate) and add 300 µL of diluted washing solution. This procedure is repeated totally three times. Rests of the washing buffer are afterwards removed by gentle tapping of the microtiter plate on a tissue cloth.
8. Pipet 100 µL each of the ready-to-use substrate into the wells. This time also the substrate blank is pipetted.
9. Cover plate with the re-usable plate cover and incubate at room temperature for 20 minutes in the dark (e.g. drawer).
10. To terminate the substrate reaction, pipet 100 µL each of the ready-to-use stop solution into the wells. Pipet also the substrate blank.
11. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, perform the reading of the absorption at 450 nm (optionally reference wavelength of 620 nm). The color is stable for at least 60 minutes.

9. EVALUATION

Example

	OD Value	Corrected OD
Substrate Blank	0.021	
Negative Control	0.023	0.002
Cut-Off Standard	0.620	0.599
Weak Positive Control	1.002	0.981
Positive Control	2.421	2.400

The above table contains only an example, which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. The described data constitute consequently **no reference values** which have to be found in other laboratories in the same way.

9.1. Qualitative Evaluation

The calculated absorptions for the patient sera, as mentioned above, are compared with the value for the cut-off standard. If the value of the sample is higher, there is a positive result. For a value below the cut-off standard, there is a negative result. It seems reasonable to define a range of $\pm 20\%$ around the value of the cut-off as a grey zone. In such a case the repetition of the test with the same serum or with a new sample of the same patient, taken after 2-4 weeks, is recommended. Both samples should be measured in parallel in the same run.

The positive control must show at least the double absorption compared with the cut-off standard.

9.2. Quantitative Evaluation

The ready-to-use standards and controls of the Borrelia IgM antibody kit are defined and expressed in arbitrary units (U/mL). This results in an exact and reproducible quantitative evaluation. Consequently for a given patient follow-up controls become possible. The values for controls and standards in units are printed on the QC data sheet.

For a quantitative evaluation the absorptions of the standards and controls are graphically drawn *point-to-point* against their concentrations. From the resulting reference curve the concentration values for each patient sample can then be extracted in relation to their absorptions. It is also possible to use automatic computer programs. As curve fit *point-to-point* has to be chosen.

Calibrator B with its concentration of 10 U/mL serves as cut-off standard. Analogous to the qualitative evaluation a range of $\pm 20\%$ around the cut-off is defined as a grey zone. Thus results between 8 and 12 U/mL are reported as borderline.

For doubtful IgM positive results and for the confirmation of positive reactions the absorption of Rheumatoid Factor should be conducted with an appropriate reagent (Cat. No. DEMJS02, RF-Adsorbent).

10. ASSAY CHARACTERISTICS

Borrelia burgdorferi ELISA	IgM
Intra-Assay-Precision	5.0 %
Inter-Assay- Precision	9.0 %
Inter-Lot- Precision	4.8 – 10.3 %
Analytical Sensitivity	0.99 U/mL
Recovery	110 – 111 %
Linearity	77 – 120 %
Cross-Reactivity	No cross-reactivity to TBEV (FSME)
Interferences	No interferences to bilirubin up to 0.3 mg/mL, hemoglobin up to 8.0 mg/mL and triglycerides up to 5.0 mg/mL.
Clinical Specificity	100 %
Clinical Sensitivity	100 %

11. REFERENCES

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, J Clin Microbiol, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiol Rev, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 1989, 321:586-597
11. Grodzicki RL, Steere AC: Comparison of Immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease, J Infect Dis, 1988, 157:790-797
12. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections, J Infect Dis, 1987, 156:183-186

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Borrelia burgdorferi IgM ELISA dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von humanen IgM-Antikörpern gegen Borrelia im Serum oder Plasma ohne vorhergehende Extraktion. Weitere Anwendungen in anderen Körperflüssigkeiten sind möglich und können beim Technischen Service von DEMEDITEC erfragt werden.

Laborergebnisse können nie allein die Grundlage eines medizinischen Befundes bilden. Es müssen immer das klinische Bild sowie weitere Untersuchungen mit berücksichtigt werden.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Borrelia burgdorferi zählt zu der Familie der Spirochäten, wobei drei Arten als humanpathogen deklariert werden: B. burgdorferi sensu stricto, B. afzelii und B. garinii. Endemiegebiete liegen in Zentral- und Osteuropa sowie Russland, China und Japan. Die Krankheit wird durch Zeckenbisse, und zwar in Europa vor allem durch Ixodes ricinus übertragen. In den Endemiegebieten wie Süddeutschland und Österreich sind bis zu 50 % der Zecken infiziert. Im klinischen Verlauf zeigt sich nach einem im ersten Stadium auftretenden Erythema migrans z.B. eine Neuroborreliose, aber auch chronische Arthritis, Enzephalitis, Meningitis, Myositis und Hepatitis wurden beobachtet. Die Labordiagnostik erfolgt über den Nachweis von Antikörpern in Blut und Liquor. Als Methoden werden ELISA, Immunfluoreszenz-, Hämagglutination oder Western-Blot eingesetzt. Neben Ganzzellextrakten wurden in letzter Zeit zunehmend aufgereinigte oder rekombinante Einzelproteine als Antigene eingesetzt. Hierbei muss allerdings in der Regel auf Sensitivität verzichtet werden. Es hat sich gezeigt, dass zwischen den verschiedenen Test-Methoden erhebliche Unterschiede in der Interpretation auftreten, so dass ein sicheres Verfahren in der Beobachtung des Titerverlaufs besteht. Der Western-Blot dient als Bestätigungstest, da elektrophoretisch aufgetrennte Einzelantigene in ihrer Reaktion mit spezifischen Serumantikörpern ausgewertet werden können. Die Borrelia burgdorferi IgG- und IgM-ELISA-Kits enthalten neben einem mit B. afzelii und B. garinii kreuzreagierenden Ganzzell-Antigenextrakt von Borrelia burgdorferi sensu stricto einen Anteil von reinem OspC von B. afzelii, wodurch die Sensitivität und die Spezifität der Tests erhöht werden. Liegt lediglich ein positives IgG-Ergebnis (IgM negativ) vor, kann man von einer Immunität des Probanden ausgehen. Wie oben erwähnt, sollte allerdings bei eindeutig klinischem Befund eine Überprüfung des Titeranstiegs mit dem gleichen Assay durchgeführt werden. Bei gleichzeitig positivem IgM-Befund ergibt sich ein Hinweis auf ein aktives Geschehen.

3. TESTPRINZIP

Der Borrelia IgM Antikörper-Test basiert auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays (EIA). Auf der Oberfläche der Mikrotiterstreifen ist Borrelia burgdorferi-Antigen gebunden. Verdünntes Patientenserum bzw. gebrauchsfertige Standards werden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Es findet eine Bindung zwischen den IgM-Antikörpern aus dem Serum und dem immobilisierten Borrelia-Antigen statt. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte mit verdünnter Waschlösung gewaschen, um nichtgebundenes Material zu entfernen. Danach wird gebrauchsfertiges Anti-human-IgM-Peroxidase Konjugat zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung (TMB) pipettiert und 20 Minuten inkubiert, wodurch in den Vertiefungen ein blauer Farbstoff entsteht. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb stattfindet. Die resultierende Farbe wird spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Die Konzentration der IgM-Antikörper ist der Intensität der Färbung direkt proportional.

4. HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für in-vitro Anwendung! Nicht schlucken oder einnehmen! Die laborüblichen Sicherheitsvorschriften sowie die Verbote von Essen, Trinken und Rauchen im Labor sind zu beachten.
- Alle Seren oder Plasmen oder darauf basierenden Puffer wurden nach anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und dabei als negativ befunden. Trotzdem sollten Vorsichtsmaßnahmen wie die Benutzung von Latexhandschuhen ergriffen werden.
- Serum- und Reagenzienreste sollten mit einer desinfizierenden Lösung (z.B. Natrium-hypochlorit, 5 %) aufgewischt und vorschriftsgemäß entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor der Testdurchführung auf Raumtemperatur (18 - 25°C) gebracht werden.
- Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien durch leichtes Kippen oder Schwenken gemischt werden. Heftiges Schütteln mit Schaumbildung sollte vermieden werden.
- Wichtig ist die Einhaltung des Zeittaktes beim Pipettieren, so dass alle Ansätze in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte den gleichen Bedingungen unterliegen.
- Bei der Entnahme der Reagenzien aus den Flaschen ist darauf zu achten, dass die Stopfen nicht kontaminiert werden. Außerdem ist auf eine mögliche Verwechslung zu achten. Der Inhalt der Fläschchen ist in der Regel oxidationsempfindlich, so dass sie nur für kurze Zeit geöffnet werden sollten.
- Zur Vermeidung einer Verschleppung oder Kreuzkontamination müssen separate Einmal-Pipettenspitzen verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind innerhalb der Verfallszeit zu benutzen.
- In Übereinstimmung mit einer guten Laborpraxis (GLP) bzw. nach ISO9001 sollten regelmäßig alle verwendeten Laborgeräte auf Richtigkeit und Präzision überprüft werden. Dies betrifft u.a. Mikroliterpipetten sowie Wasch- und Messgeräte (ELISA-Reader).
- Der Kontakt vor allem der Stopp-Lösung und des Substrats mit Haut, Auge und Schleimhäuten ist zu vermeiden, da mögliche Reizungen, Verätzungen oder Vergiftungsgefahr bestehen.

5. INHALT DES TESTBESTECKS

Komponenten	Volumen / Menge
Borrelia-Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen	12
Kalibrator A (Negative Kontrolle)	2 mL
Kalibrator B (Cut-Off Standard)	2 mL
Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)	2 mL
Kalibrator D (Positive Kontrolle)	2 mL
Anti-human-IgM-Enzymkonjugat	15 mL
Substratlösung	15 mL
Stopp-Lösung	15 mL
Probenverdünner	60 mL
Waschpuffer (10x)	60 mL
Plastikbeutel	1

Lagerung und Aufbrauchsfristen (Angabe der Verfallsdaten auf den Etiketten)

Lagern Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C. Nach dem Gebrauch sollten die Platten verpackt, die Flaschen mit den zugehörigen Deckeln verschlossen und das Kit wieder bei 2-8°C gelagert werden. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden, der endverdünnte Waschpuffer hält 4 Wochen bei 2-8°C.

5.1. Mikrotiterstreifen

12 Streifen mit je 8 abbrechbaren Vertiefungen, beschichtet mit Borrelia-Antigen (Mischung von Borrelia sensu stricto, Borrelia afzelii und Borrelia garinii). Gebrauchsfertig.

5.2. Kalibrator A (Negative Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, enthält keine Antikörper gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.3. Kalibrator B (Cut-Off-Standard)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit niedriger Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.4. Kalibrator C (Schwach Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit mittlerer Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.5. Kalibrator D (Positive Kontrolle)

2 mL, menschliches mit PBS verdünntes Serum, mit hoher Konzentration an IgM-Antikörpern gegen Borrelia. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon und 0,01 % Bromonitrodioxan. Gebrauchsfertig.

5.6. Anti-human-IgM-Enzymkonjugat

15 mL, Anti-human-IgM-POD (Kaninchen), in proteinhaltiger Pufferlösung. Zusatz von 0,01 % Methylisothiazolon, 0,01 % Bromonitrodioxan und 5 mg/l ProclinTM. Gebrauchsfertig.

5.7. Substratlösung

15 mL, TMB (Tetramethylbenzidin). Gebrauchsfertig.

5.8. Stopp-Lösung

15 mL, 1 N saure Lösung. Gebrauchsfertig.

5.9. Probenverdünner

60 mL, PBS/BSA Puffer. Zusatz von 0,095 % Natriumazid. Gebrauchsfertig.

5.10. Waschpuffer

60 mL, PBS + Tween 20, als 10x Konzentrat. Gebrauchslösung: 1+9 mit dest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

5.11. Plastikbeutel

Verschließbar, für die trockene Lagerung der nichtbenutzten Streifen.

6. ERFORDERLICHE GERÄTE UND HILFSMITTEL

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Mikro- bzw. Mehrkanalpipetten
- Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)
- Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Reagenzgläser für die Serumverdünnung
- Bidestilliertes Wasser
- Wieder verwendbare schwarze Mikrotiterplattendeckel (Auf Anfrage bei Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich)

7. GEWINNUNG, VORBEREITUNG UND AUFBEWAHRUNG DER PROBEN

Grundsätzlich kann für die Bestimmung Serum oder Plasma (EDTA, Heparin) verwendet werden. Aus dem aseptisch durch Venenpunktion gewonnenen Blut wird nach der Gerinnung das Serum durch Zentrifugation abgetrennt. Die Serum- bzw. Plasma-Proben sind bis zu 7 Tagen gekühlt (2-8°C) haltbar; bei längerer Aufbewahrung sollten sie bei -20°C gelagert werden. Die Proben sollten nicht mehrmals eingefroren und aufgetaut werden. Lipämische, hämolytische, oder bakteriell kontaminierte Proben können zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen führen.

Für die Durchführung des Tests werden die Proben (nicht die Standards) mit gebrauchsfertigem Probenverdünner 1:101 verdünnt (z.B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünner).

8. TESTDURCHFÜHRUNG

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung: vor der Benutzung 1:10 (1+9) mit bidest. Wasser verdünnen. Falls bei der gekühlten Lagerung Kristalle ausfallen sollten, das Konzentrat 15 Minuten im Wasserbad (37°C) erwärmen.

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss strikt eingehalten werden.
- Vor dem Pipettieren müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Mit jedem Test muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Nicht benötigte Antigen-beschichtete Mikrotiterstreifen sofort nach Entnahme der erforderlichen Menge wieder im verschließbaren Beutel mit Trockenmittel in den Kühlschrank stellen.

8.2. Einzelne Assay-Schritte

1. Für die Standards und die Proben sowie für einen Substratleerwert eine ausreichende Anzahl an Mikrotitervertiefungen vorbereiten.
2. Je 100 µL der **verdünnten** (1:101) Proben bzw. der **gebrauchsfertigen** Standards in die Vertiefungen pipettieren. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
3. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 60 Minuten inkubieren.
4. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
5. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen geben. Eine Vertiefung für den Substrat-Leerwert freilassen.
6. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
7. Vertiefungen der Platte entleeren (auskippen oder absaugen) und 300 µL endverdünnte Waschlösung dazugeben. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Waschpufferreste werden anschließend durch leichtes Ausschlagen der Mikrotiterplatte auf einem Zellstofftuch entfernt.
8. Je 100 µL des gebrauchsfertigen Substrats in die Vertiefungen geben. Diesmal auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
9. Platte mit dem Mikrotiterplattendeckel abdecken und bei Raumtemperatur im Dunkeln (z.B. Schublade) 20 Minuten inkubieren.
10. Zur Beendigung der Substratreaktion je 100 µL der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in die Vertiefungen geben. Auch den Substrat-Leerwert pipettieren.
11. Nach sorgfältigem Mischen und Abwischen des Plattenbodens erfolgt die Messung der Extinktion bei 450 nm (evtl. Referenzwellenlänge 620 nm). Die Farbe ist maximal 60 Minuten stabil.

9. AUSWERTUNG

Beispiel

	Messwerte (OD)	korr. Messwerte (OD)
Substrat-Leerwert	0,021	
Negativ-Kontrolle	0,023	0,002
Cut-Off Standard	0,620	0,599
schwach Positiv-Kontrolle	1,002	0,981
Positiv-Kontrolle	2,421	2,400

Es handelt sich um ein Beispiel, das unter zufälligen Temperatur- und Umgebungsbedingungen erstellt wurde. **Die obige Tabelle enthält demnach keine Sollwerte**, die in anderen Laboratorien in gleicher Art wiedergefunden werden müssen.

9.1. Qualitative Auswertung

Die o.g. berechneten Extinktionen für die Patientenproben werden mit dem Wert für den Cut-Off Standard verglichen. Liegt das Ergebnis der Probe höher, handelt es sich um ein positives Resultat. Bei einem Wert unterhalb des Cut-Off Standards liegt ein negatives Resultat vor. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, einen Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone zu definieren. Liegt ein solcher Fall vor, ist eine Wiederholung des Tests mit dem gleichen Serum oder mit einer nach 2-4 Wochen neu abgenommenen Probe des Patienten zu empfehlen. Beide Proben sollten parallel in einem Testansatz gemessen werden.

Die positive Kontrolle muss mindestens die doppelte Extinktion verglichen mit dem Cut-Off Standard zeigen.

9.2. Quantitative Auswertung

Die gebrauchsfertigen Standards und Kontrollen des Borrelia IgM Antikörper-Kits sind auf Units (U/mL) eingestellt worden. Dies ermöglicht eine exakte und reproduzierbare quantitative Auswertung. Auch Verlaufskontrollen für einen gegebenen Patienten sind hiermit möglich. Die Werte für Kontrollen und Standards sind auf dem QC Datenblatt angegeben.

Zur Auswertung werden die Extinktionen der Standards bzw. Kontrollen gegen ihre Konzentrationen *Punkt-zu-Punkt* graphisch aufgetragen. Aus der resultierenden Eichkurve kann dann für die Extinktion jeder Patientenprobe das entsprechende Konzentrations-Ergebnis abgelesen werden. Es können auch automatische Rechnerprogramme eingesetzt werden. Hierbei sollte als Kurvenfitting *Punkt-zu-Punkt* eingestellt werden.

Kalibrator B mit einer Konzentration von 10 U/ml fungiert als Cut-Off Standard. Analog zur qualitativen Auswertung wird ein Bereich von +/- 20% um den Wert des Cut-Offs als Grauzone definiert. Folglich werden Resultate zwischen 8 und 12 U/ml als grenzwertig befundet.

Bei fraglich IgM positiven Ergebnissen bzw. zur Absicherung einer positiven Reaktion sollte eine Rheumafaktor-Absorption mit einem geeigneten Reagenz (Best.-Nr. DEMJS02, RF-Adsorbent) vorgenommen werden.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Borrelia burgdorferi ELISA	IgM
Intra-Assay-Präzision	5,0 %
Inter-Assay-Präzision	9,0 %
Inter-Lot-Präzision	4,8 – 10,3 %
Analytische Sensitivität	0,99 U/mL
Wiederfindung	110 – 111 %
Linearität	77 – 120 %
Kreuzreaktivität	Keine Kreuzreaktivität gegen FSME
Interferenzen	Keine Interferenzen mit Bilirubin bis zu 0,3 mg/mL, Hämoglobin bis zu 8,0 mg/mL und Triglyzeriden bis zu 5,0 mg/mL
Klinische Spezifität	100 %
Klinische Sensitivität	100 %

11. LITERATUR

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, J Clin Microbiol, 1992, 30:370-376
2. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263: 412-419
3. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 1993; 167:392-400
4. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 1993; 16:208-214
5. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiol Rev, 1986, 50:381-400
6. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol 1992, 42:378-383
7. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgM antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 1988, 158:754-760
8. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 1994, 182:255-270
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, Zbl Bakt Hyg A, 1986, 263:92-102
10. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 1989, 321:586-597

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
CE	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità