

SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM

Spotimmunoassay zum Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen
Borrelia burgdorferi sensu lato in humanem Serum oder Plasma

REF SP-006-10 G-S6 ▽ 48 **REF** SP-006-10 G-S12 ▽ 96 **REF** SP-006-10 G-S24 ▽ 2x 96
REF SP-006-10 G-S120 ▽ 10x 96 **IVD** *In-vitro*- Diagnostikum **CE**
REF SP-006-10 M-S6 ▽ 48 **REF** SP-006-10 M-S12 ▽ 96 **REF** SP-006-10 M-S24 ▽ 2x 96
REF SP-006-10 M-S120 ▽ 10x 96 **IVD** *In-vitro*- Diagnostikum **CE**



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 33767 791-10 · Fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Einführung

Die Lyme-Borreliose ist eine systemische Infektionskrankheit mit vielfältigen klinischen Symptomen. Man unterscheidet drei Stadien der Erkrankung unter Beteiligung mehrerer Organsysteme. Leitsymptome des 1. Stadiums (4 - 8 Wochen) sind das Erythema chronicum migrans und eine lokale oder generalisierte Lymphadenopathie (Lymphadenosis cutis benigna). Die klinischen Erscheinungen des 2. Stadiums (1 - 12 Monate) äußern sich als Meningitis, Meningoradikulitis, Encephalitis bis zu Hemiparesen, Muskel- und Gelenkschmerzen, insbesondere Kniegelenksarthritiden. Seltener sind Manifestationen am Herzen als lebensbedrohliche Myokarditis / Pankarditis. Das 3. Stadium (Monate bis Jahre) ist durch chronischen Befall des Nervensystems (Neuroborreliose, progressive Enzephalomyelitis), der Haut (Acrodermatitis chronica atrophicans) und der Gelenke (chronische erosive Arthritis) gekennzeichnet. Besonders die Spätmanifestationen der Borreliose können die Lebensqualität stark beeinträchtigen und sind antibiotisch schwer zu therapieren. Eine frühe Diagnostik von Borrelieninfektionen ist deshalb von großer Bedeutung. Erreger der Lyme-Borreliose ist eine 1982 von BURGDORFER aus Zecken isolierte Spirochäte, die der Gattung *Borrelia* zugeordnet wurde. Hauptvektor von *Borrelia burgdorferi* in Europa ist der Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus*. Entsprechend des Vorkommens der Zecken in walddreichen ländlichen Gebieten finden sich in diesen Regionen die häufigsten Erkrankungen mit einem Gipfel im Sommer und Herbst. Die Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Menschen geschieht durch Darminhalt / Fäkaltröpfchen der Zecken während des Saugaktes. Für Borrelieninfektionen besonders gefährdet sind in Forstwirtschaft und Gartenbau beschäftigte Personen, Jäger, Anwohner von Waldrändern, Camper in Waldgebieten sowie Soldaten bei militärischen Übungen im Gelände.

Regional unterschiedlich wird mit einer Borreliose Inzidenz von 2 – 40 / 100.000 (Mitteldeutschland) bis 300 / 100.000 Einwohner (Österreich) gerechnet.

Die Dunkelziffer ist vermutlich höher, da ein Zeckenstich nicht immer bemerkt wird oder erinnernlich ist und sich das typische Erythema chronicum migrans nur in etwa 50 % der *Borrelia burgdorferi* Infektionen entwickelt. Der sicherste Nachweis einer Borrelien-Infektion ist zweifellos die kulturelle Anzucht der Erreger aus Blut, Liquor oder Hautbiopsien. Diese wird jedoch limitiert durch lange

Vermehrungszeiten der Borrelien, die komplexe Zusammensetzung der Nährmedien und die relativ geringe Nachweisempfindlichkeit bei Anzucht aus Patientenmaterial. Als Routineverfahren ist die Kultur daher ebenso wenig geeignet wie der immunhistologische Borreliennachweis in Gewebeschnitten. Die Methode der Wahl (MIQ 2000) für die erste Stufe der Diagnostik ist deshalb der Nachweis von IgG- und / oder IgM-Antikörpern mittels Enzymimmunoassay (ELISA). Im ELISA werden Borrelien-Sonikate, partiell gereinigte oder rekombinante Antigene zur Beschichtung der festen Phase eingesetzt. Wegen des regional unterschiedlichen Vorkommens von Subtypen (Genospezies) und der bekannten Variabilität der Oberflächenproteine von *Borrelia burgdorferi* werden häufig Antigengemische bevorzugt. Als Bestätigungstest (zweite Stufe) haben sich die Line Immunoassays mittlerweile fest etabliert. Die serologischen Ergebnisse müssen immer im Zusammenhang mit den klinischen Befunden interpretiert werden. Negative Serumbefunde schließen eine Lyme-Borreliose nicht aus, denn bei jedem Infektionsstadium gibt es seronegative Fälle.

Literatur:

1. Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B.: Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Ssensu Lato. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1433-1444
2. Kamradt, T., Krause, A., Priem, S., Burmester, G. R.: Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie. Dt. Ärzteblatt 1998, 95: 214-219
3. Porstmann, T., Labordiagnostik der Borrelieninfektion, in: Talaska, T. (Hrsg.): Symposium Lyme Borreliose: 35-38, DPC Akademie Bad Nauheim 1998
4. Talaska, T., Diagnostische Methoden bei Borrelien-Infektionen - Übersicht, in: Talaska, T. (Hrsg.): Für die Praxis: Lyme-Borreliose. ISBN 3-00-002363-1
5. Tewa, F., und Braun, R.: Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelieninfektion. Clin. Lab. 1998, 44: 897-902
6. Wilske, B., Fingerle, V., Hauser, U. und Rössler, D.: Borrelien, Diagnostische Bibliothek 48: 1-12 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Juni 1997
7. Lawrenz, M. B., Hardham, J. M., Owens, R. T., Nowakowsky, J., Steere, A. C., Wormser, G. P., Norris, S. J.: Human Antibody Responses to VlsE Antigenic Variation Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1999, 37/12: 3997-4004
8. Liang, T. F., Steere, A. C., Marques A. R., Johnson, B. J. B., Miller J. N., Philipp M. T.: Sensitive and Specific Serodiagnosis of Lyme Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Peptide Based on an Immunodominant Conserved Region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J. Clin. Microbiol. 1999, 37/12: 3990-3996
9. Peltomaa, M., McHugh, G., Steere, A. C.: The VlsE (IR₆) Peptide ELISA in the Serodiagnosis of Lyme Facial Paralysis. Otolaryngology & Neurology 2004, 25: 838-841
10. Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B. J. B., Wilske, B.: Significant Improvement of the Recombinant *Borrelia*-Specific Immunoglobulin G Immunoblot Test by Addition of VlsE and a DbpA Homologue Derived from *Borrelia garinii* for Diagnosis of Early Neuroborreliosis. J. Clin. Microbiol. 2003, 41/3: 1299-1303
11. Wilske, B., Zöller, L., Brade, V., Eiffert, H., Göbel, U.B., Stanek, G., Pfister, H.W. (Mitarbeit): Lyme-Borreliose. MIQ 12-2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Urban & Fischer, 2000
12. Wilske, B. et al.: Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1993, 61:2182-2191
13. Goettner, G., Schulte-Spechtel U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B. and Fingerle, V.: Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues. J. Clin. Microbiol. 2005, 43 (8): 3602-3609
14. Simpson W. J., Schrupf, M. E., and Schwan, T.G.: Reactivity of Human Lyme Borreliosis Sera with a 39-Kilodalton Antigen Specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (6): 1329-1337
15. Rössler, D., Eiffert, H., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Praec-Mursic, V., Teepe, J., Schlott, T., Soutschek, E.: Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. Med. Microbiol. Immunol. 1995, 184 (1): 23-32
16. Roessler, D., Hauser, U., Wilske, B.: Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 1997, 35 (11): 2752-2758
17. Panelius, J., Lahdenne, P., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Oksi, J. and Seppälä, I.: Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, B. afzelii and B. garinii in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Med. Microbiol. 2002, 51: 731-739
18. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007, 49: 13-21

Anwendungsbereich

Der **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM Test** ist ein *In-vitro*-Diagnostikum (Spotimmunoassay, SIA) zum Nachweis von *Borrelia*-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma.

Testprinzip

Der **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM Test** ist ein Festphasen-immunoassay basierend auf der Verwendung rekombinanter *Borrelia*-Antigene, die in Arrayanordnung (Spotarray) auf den Boden der Kavitäten von 96well-Mikrotiterplatten fixiert sind, und die als Fänger-moleküle für Antikörper gegen *Borrelia*-Antigene dienen. Spezifisch gebundene Antikörper werden mit Peroxidase-(POD)-markierten anti-human IgG- bzw. IgM-Antikörpern und einer nachgeschalteten Substratreaktion mit Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. An den Stellen, an welchen sich Immunkomplexe ausgebildet haben, entwickeln sich blaue Spots durch Präzipitations-Produkte der farblosen Substratlösung. Die Farbintensität der Spots korreliert mit der Antikörperkonzentration. Die schwach- bis dunkelblauen Spots sind ohne Hilfsmittel sichtbar.

Der Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Inkubation der zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten in einer Verdünnung von 1 : 101 in den ausgewählten Kavitäten. Entfernung der nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 2

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit POD-markierten Konjugatantikörpern gegen humane Antikörper vom IgG- bzw. IgM-Typ. Entfernung der nicht gebundenen Konjugat-antikörper durch Absaugen und 3maliges Waschen der Kavitäten mit Waschlösung.

Schritt 3

Inkubation der Kavitäten bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit Substratlösung SeramunBlau® spot dark. Stoppen der Reaktion durch Absaugen der Substratlösung. Entfernen von Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch. Die Färbung der entwickelten Arrays ist bei dunkler Lagerung stabil.

Innerhalb von 24 h nach Beendigung der Nachweisreaktion können von den entwickelten Analysen mit den Scannern Seramun *SpotSight®* plate oder Seramun *SpotSight®* strip Bildaufnahmen der Kavitäten (Images) erstellt und unter Verwendung der Software Seramun *SpotSight®* scan quantitativ analysiert werden. Unter Berücksichtigung der testspezifischen Auswertekriterien wird das Testergebnis ermittelt.

Verwendete Borrelien Antigene

Bezeichnung*	Charakterisierung / Spezifität		Bedeutung	Herkunft
VlsE (7, 8, 9, 10, 13)	Oberflächenlipoprotein, variable major protein-like sequence expressed	spezifisch	Häufig schon im Frühstadium nachweisbar, häufig IgG-Antwort	<i>B. afzelii</i>
p39 (BmpA) (1, 11, 14, 16)	Flagellinkomplex, Borrelia membrane protein A	hochspezifisch	Häufig schon im Frühstadium nachweisbar	<i>B. afzelii</i>
p58 (1, 11)	nicht näher charakterisiert	spezifisch	Häufig im Stadium 3	<i>B. garinii</i>
p100 (1, 11, 15)	Protein der Membran-Vesikel auf der Oberfläche	hochspezifisch	Marker für spätes Infektionsstadium	<i>B. afzelii</i>
p23 (OspC)** (1, 6, 11, 12, 17)	Oberflächenprotein C, Outer surface protein C	hochspezifisch	Marker für Frühstadium, häufig IgM-Antwort	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>
p18 (DbpA)** (10, 11, 13)	Oberflächenprotein, Decorin binding protein A	spezifisch	Marker vor allem für Neuroborreliose und Lyme-Arthritis, IgM- und IgG-Antwort	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>

* Die Nomenklatur der Antigene wird in der Literatur hinsichtlich Molekulargewicht, Spezifität und Wertigkeit in den einzelnen Erkrankungsstadien nicht einheitlich wiedergegeben. ** Jede Antigenspezies ist separat gedruckt.

Testkomponenten

	Für 48 Bestimmungen	Für 96 Bestimmungen	Für 2x 96 Bestimmungen	Für 10x 96 Bestimmungen
1	WELLS Kavitäten mit Arrays 6 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	2x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel	10x 12 teilbare Streifen zu je 8 Kavitäten im Rahmen Vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
	IgG-Bestimmung: Farbmarkierung dunkelblau; IgM-Bestimmung: Farbmarkierung hellblau			
2	WASHBUE CONC 10X Waschpuffer Seramun® Wash buffer A 10-fach	100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	2x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe	10x 100 ml Konzentrat transparente Flasche weiße Kappe
3	DIL Probenverdünnungs- puffer Seramun® Sample diluent B	55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	2x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe	20x 55 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche schwarze Kappe
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- POD- Konjugat oder Anti-human IgM- POD- Konjugat	8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe	10x 8 ml gebrauchsfertig rot gefärbt transparente Flasche rote Kappe
	CONJ HRP IgM			
5	SUBSTR TMB SeramunBlau® spot dark 3.3' 5.5' - Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	2x 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe	10x 8 ml gebrauchsfertig grün gefärbt transparente Flasche grüne Kappe
6	COVER Abdeckfolie	2x	4x	20x
7	SWAB Tupfer mit 70 % (v/v) Isopropylalkohol	3x2	12x2	60x2

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Proben sollten steril entnommen und maximal 7 Tage bei 2...8 °C gelagert werden. Serum sollte nach der Gerinnung so schnell wie möglich abzentrifugiert werden. Bei längerer Aufbewahrung sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden. Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden.

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparin-Plasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (z.B. 10 µl Probe und 1000 µl Puffer) mit dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

• Einstellbare Einkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Einstellbare Mehrkanal-Mikropipetten und passende Pipettenspitzen • Reagenziencontainer für Mehrkanal-Mikropipetten • destilliertes oder deionisiertes Wasser • Fusselfreies Filterpapier • Teströhrchen (1 ml) zur Probenverdünnung • Becherglas und Messzylinder • Stoppuhr • Washer für 96well-Mikrotiterplatten (optional) • Auffanggefäß für infektiöse Lösungen • Seramun *SpotSight*® plate oder Seramun *SpotSight*® strip Scanner mit Auswertesoftware Seramun *SpotSight*® scan

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck enthält Reagenzien für 1x 48, 1x 96, 2x 96 oder 10x 96 Bestimmungen. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und vakuumversiegelten Testkomponenten ist bei 2...8 °C-Lagerung bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 3 Monate haltbar. Die gebrauchsfertig verdünnte Waschlösung ist bei einer Lagerung bei 2...8 °C bis zu 4 Wochen und bei einer Lagerung bei RT bis zu 2 Wochen verwendbar.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien und die vakuumversiegelten Testkomponenten auf Raumtemperatur zu erwärmen. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenbeutel in den Folienbeutel zurücklegen und verschließen.

1 Teil Waschpufferkonzentrat **WASHBUF CONC 10X** mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Beispiel: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser. Die Waschlösung ist vor Verwendung gründlich zu durchmischen. Das Substrat **SUBSTR TMB** ist vor direktem Lichteinfall zu schützen! Der Test darf nicht durchgeführt werden, sollte die Substratlösung **SUBSTR TMB** dunkel gefärbt sein oder dunkle Partikel aufweisen!

Arbeitsplatzanforderungen

Für die Durchführung von Spotimmunoassays wird ein sauberer und faserfreier Arbeitsplatz benötigt. An der Unterseite der Kavitäten anheftende Fasern führen zu fehlerhaften Resultaten. Arbeitsplatz und Kit-Komponenten sollten nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt sein.

Testdurchführung

Durchführung bei Raumtemperatur (18...25 °C). Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Für die Handhabung der SeraSpot® Teste wird empfohlen, den Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) zu verwenden. Der Kit ist zum mehrfachen Gebrauch konzipiert.

Wichtige Hinweise:

- **Mechanischer Kontakt (Kratzen) auf dem Boden der Kavitäten mit Pipettenspitzen oder Washer-Nadeln ist zu vermeiden. Dadurch wird der Array irreparabel geschädigt!**
- **Alle Flüssigreagenzien (Probe, Konjugat und Substrat) sind blasenfrei in die Kavitäten einzubringen!**
- **Vor dem Erstellen von Images der entwickelten Kavitäten ist es notwendig, die Unterseite der Kavitäten von anhaftenden Fusseln, mit dem im Kit enthaltenen Tupfer **SWAB** zu reinigen!**
- **Durch die Trocknung der Restflüssigkeit erscheinen die Images kontrastreicher, dadurch kann es bei wiederholtem Scannen zu geringfügigen Abweichungen der Messwerte kommen. Die Bewertung der einzelnen Parameter wird dadurch nicht verändert.**

Arbeitsschritte

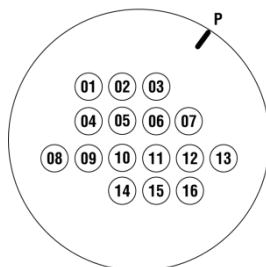
1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten **WELLS** auf Raumtemperatur (RT) erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch leicht schütteln, Schaumbildung vermeiden.
2. **100 µl** 1:101 verdünnte Probe pro Kavität pipettieren. Herstellung der Arbeitsverdünnung der Patientenprobe z.B. 10 µl Serum + 1000 µl Probenverdünnungspuffer.
3. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
4. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
5. **50 µl** des gebrauchsfertigen Konjugates **CONJ HRP IgG** oder **CONJ HRP IgM** pro Kavität pipettieren.
6. Platte mit Abdeckfolie **COVER** abkleben, für **30 min** bei RT inkubieren.
7. **Lösungen absaugen.** Kavitäten **3 x** mit jeweils **400 µl** Waschlösung, hergestellt aus **WASHBUF CONC 10X**, waschen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
8. **50 µl** der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung **SUBSTR TMB** pro Kavität pipettieren.
9. Platte abdecken und lichtgeschützt für **30 min** bei RT inkubieren.
10. Substratlösung absaugen. Restflüssigkeit durch Ausschlagen auf fusselfreiem Tuch entfernen.
11. Unterseite der Kavitäten mit Tupfer **SWAB** abwischen.
12. Bildaufnahme der Kavitäten mit dem Scanner Seramun SpotSight® plate / Seramun SpotSight® strip und Imageanalyse mit der Software Seramun SpotSight® scan. Erfolgt die Bildaufnahme mit dem Scanner Seramun SpotSight® strip, sind die Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen zu entnehmen und in die Streifenaufnahme des Scanners einzulegen.

Die Durchführung der Absaug- und Waschschrte kann manuell oder mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Washers erfolgen.

Nach dem Absaugen der Substratlösung sind die entwickelten Spots in der Platte bei Aufbewahrung im Dunkeln 24 Stunden stabil.

Auswertung der Ergebnisse

Arraylayout



Parameter

04	VlsE (AFZ)
05	p39 (AFZ)
06	p58 (GAR)
07	p100 (AFZ)
08	OspC (AFZ)
09	OspC (GAR)
10	OspC (BUR)
11	DbpA (AFZ)
12	DbpA (GAR)
13	DbpA (BUR)

Kontrollen

01	Positivkontrolle (PC)
02	Cut-off Kontrolle (CO)
03	Negativkontrolle (NC)
14	IgG Konjugatkontrolle (GC)
15	IgM Konjugatkontrolle (MC)
16	Serumkontrolle (SC)

P Positionsmarkierung

Gültigkeitskriterien für den Test

Der *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgM Test enthält die folgenden Kontrollspots:

1. Positivkontrolle (PC). Intensiv gefärbter Spot, dunkler als Cut-off Kontrolle. Immer angefärbt.
2. Cut-off Kontrolle (CO). Schwach gefärbter Spot. Wird für die Bewertung der Parameter-spezifischen Signale verwendet.
3. Negativkontrolle (NC). Sehr schwach gefärbter Spot, die Farbintensität der Negativkontrolle muss kleiner als die der Cut-off Kontrolle sein.
4. Funktionskontrolle (IgG, IgM Konjugatkontrolle, GC, MC). Intensiv gefärbte Spots mit unterschiedlicher Position beim IgG- bzw. IgM-Nachweis. Dient zur Kontrolle des Antikörperisotyps.
5. Serumkontrolle (SC). Intensiv gefärbter Spot, immer angefärbt, wenn sich Probe im Well befunden hat. Ein Ausbleiben der Färbung des Spots der Serumkontrolle deutet auf das Fehlen von Probe hin.

Der Test kann nicht ausgewertet werden, wenn eine der unter Punkt 1. bis 5. aufgeführten Gültigkeitskriterien nicht erfüllt ist.

Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung erfolgt unter Verwendung der *SeraSpot*® Mess- und Auswertetechnik. Eine visuelle Plausibilitätskontrolle ist mit Hilfe der im Starter-Kit (Artikel-Nr.: SP-000-1) enthaltenen Lupe möglich.

Die Ergebnisse werden entsprechend der MIQ-Richtlinie (12) wie folgt interpretiert:

Bewertung	IgG	IgM
negativ	max. 1 Antigen-Spot* (außer VlsE-Spot) > Cut-off-Kontrolle	kein Antigen-Spot > Cut-off-Kontrolle
grenzwertig	VlsE-Spot > Cut-off-Kontrolle	ein Antigen-Spot* (außer OspC*) > Cut-off-Kontrolle
positiv	zwei oder mehrere Antigen-Spots* > Cut-off-Kontrolle	OspC*- Spot(s) oder zwei andere Antigen-Spots* > Cut-off-Kontrolle

* Mehrere OspC-Spots zählen als 1 Spot / mehrere DbpA-Spots zählen als 1 Spot

Grenzen der Methode

Eine Interpretation der Ergebnisse muss in enger Verbindung mit klinischen Befunden erfolgen. Negative Serumbefunde schließen eine Lyme-Borreliose nicht aus, denn in jedem Infektionsstadium gibt es seronegative Fälle. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Kontaminationen der Reagenzien oder Proben durch Bakterien oder Pilze können zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben (Konzentration bis zu 500 mg/dl Hämoglobin, 1000 mg/dl Lipide und 20 mg/dl Bilirubin C / Bilirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren können die Ergebnisse ab einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen.

Testdurchführung

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können zu falschen Ergebnissen führen.

Das Einbringen von Luftblasen beim Pipettieren der Proben und/oder Reagenzien bewirkt eine ungleichmäßige Signalausbildung des Arrays, wodurch eine Auswertung nicht mehr möglich ist.

Durch Kratzer auf dem Wellboden beschädigte Arrays sind für die Auswertung nicht verwendbar.

Im Arraybereich anhaftende Fasern oder Partikel interferieren mit der Imageanalyse.

Leistungsmerkmale

Diagnostische Sensitivität

1. Vergleichende Untersuchung serologisch vorcharakterisierter Proben im SeraSpot® Anti-Borrelia-10 Test und einem Referenztest

Serologisch vorcharakterisierte Proben von Patienten mit Verdacht auf Borreliose (n = 370 (IgG-Nachweis), n = 370 (IgM-Nachweis); Referenztest 1) wurden im SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM Test untersucht („Initiale Sensitivität“). Proben mit diskrepanten Resultaten wurden in einem zweiten Assay zum anti-Borrelia-Antikörper-Nachweis nachgetestet, wobei die im Referenztest 2 erzielten Ergebnisse der endgültigen Statusbestimmung, der im SeraSpot®-Test zum Referenztest 1 diskrepant bestimmten Proben dienten („Berichtigte Sensitivität“).

IgG	n = 370	Referenztest 1		
		positiv (n = 205)	grenzwertig (n = 7)	negativ (n = 158)
SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG	positiv	193	4	11
	grenzwertig	7	1	9
	negativ	5	2	138

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **96,7 %**

Berichtigte Sensitivität: **98,2 %**

IgM	n = 370	Referenztest 1		
		positiv (n = 160)	grenzwertig (n = 2)	negativ (n = 208)
SeraSpot® Anti- Borrelia-10 IgM	positiv	151	0	22
	grenzwertig	0	1	8
	negativ	9	1	178

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Sensitivität: **93,8 %**

Berichtigte Sensitivität: **97,2 %**

Diagnostische Spezifität

Ein Kollektiv serologisch vorcharakterisierter Blutspenderseren (n = 150; Referenztest 1) wurde im *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgM Test untersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden, wie unter „Diagnostische Sensitivität“ beschrieben, getestet und bewertet.

IgG		Referenztest 1		
		positiv (n = 4)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 146)
SeraSpot ® Anti-Borrelia-10 IgG	positiv	3	0	2
	grenzwertig	0	0	1
	negativ	1	0	143

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Initiale Spezifität: **97,9 %**

Berichtigte Spezifität: **98,6 %**

IgM		Referenztest 1		
		positiv (n = 4)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 146)
SeraSpot ® Anti- Borrelia-10 IgM	positiv	4	0	0
	grenzwertig	0	0	0
	negativ	0	0	146

Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.

Spezifität: **100,0 %**

Kreuzreaktivität

Potentiell kreuzreaktive Proben wurden im SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM Test getestet und mit einem Referenztest zum anti-Borrelia-Antikörper-Nachweis nachuntersucht. Proben mit diskrepanten Resultaten wurden, wie unter „Diagnostische Sensitivität“ beschrieben, getestet und bewertet.

SeraSpot®	EBV (n = 23)	IgG, Referenztest 1			IgM, Referenztest 1		
		positiv (n = 1)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 22)	positiv (n = 2)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 21)
	positiv	1	0	0	1	0	0
	grenzwertig	0	0	0	0	0	1
	negativ	0	0	22	1	0	20
	Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.						
		Spezifität: 100,0 %			Initiale Spezifität: 95,2 %		
					Berichtigte Spezifität: 100,0 %		
SeraSpot®	Rheumafaktor (n = 30)	IgG, Referenztest 1			IgM, Referenztest 1		
		positiv (n = 0)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 30)	positiv (n = 0)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 30)
	positiv	0	0	0	0	0	0
	grenzwertig	0	0	0	0	0	0
	negativ	0	0	30	0	0	30
	Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.						
		Spezifität: 100,0 %			Spezifität: 100,0 %		
SeraSpot®	Autoimmun (n = 51)	IgG, Referenztest 1			IgM, Referenztest 1		
		positiv (n = 3)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 48)	positiv (n = 2)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 49)
	positiv	3	0	0	2	0	1
	grenzwertig	0	0	1	0	0	2
	negativ	0	0	47	0	0	46
	Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.						
		Initiale Spezifität: 97,9 %			Initiale Spezifität: 93,9 %		
		Berichtigte Spezifität: 100,0 %			Berichtigte Spezifität: 95,8 %		
SeraSpot®	Syphilis (n = 48)	IgG, Referenztest 1			IgM, Referenztest 1		
		positiv (n = 2)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 46)	positiv (n = 2)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 46)
	positiv	2	0	0	2	0	1
	grenzwertig	0	0	0	0	0	1
	negativ	0	0	46	0	0	44
	Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.						
		Spezifität: 100,0 %			Initiale Spezifität: 95,7 %		
					Berichtigte Spezifität: 95,7 %		

Untersuchung von Schwangeren-Seren

SeraSpot®	Schwangere (n = 50)	IgG, Referenztest 1			IgM, Referenztest 1		
		positiv (n = 3)	grenzwertig (n = 0)	negativ (n = 47)	positiv (n = 2)	grenzwertig (n = 3)	negativ (n = 45)
	positiv	0	0	0	2	0	1
	grenzwertig	0	0	0	0	0	4
	negativ	3	0	47	0	3	40
	Grenzwertige Proben werden positiv bewertet.						
		Spezifität: 100,0 %			Initiale Spezifität: 88,9 %		
					Berichtigte Spezifität: 88,9 %		

Präzision

Proben mit bekannter Antikörperreaktivität wurden im SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM Test untersucht und die Farbindensitäten der Spots (RAW) gemessen. Aus den erhaltenen Messwerten wurden die Variationskoeffizienten (VK) ermittelt.

IgG-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	RAW $\bar{x}$ n = 8	VK* [%]	RAW $\bar{x}$ n = 48	VK* [%]	RAW $\bar{x}$ n = 144	VK* [%]
VisE (AFZ)	153,3	1,5	151,8	1,7	154,5	2,0
p39 (AFZ)	114,2	2,7	111,6	4,9	117,4	6,8
p58 (GAR)	143,0	2,8	145,5	3,0	154,4	6,0
p100 (AFZ)	53,3	5,4	50,5	8,2	55,8	8,9
OspC (AFZ)	34,9	4,9	34,2	5,4	35,5	4,0
DbpA (AFZ)	159,9	1,2	165,3	2,4	167,4	3,0
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

VK*: Der VK für RAW-Werte < 20 wurde nicht ermittelt.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*

IgM-Nachweis						
	Intra-Assay-VK		Inter-Assay-VK		Inter-Chargen-VK	
	RAW $\bar{x}$ n = 8	VK* [%]	RAW $\bar{x}$ n = 48	VK* [%]	RAW $\bar{x}$ n = 144	VK* [%]
OspC (AFZ)	103,5	5,8	108,5	2,1	107,1	2,6
OspC (GAR)	105,4	3,5	107,8	3,8	108,1	2,2
OspC (BUR)	109,2	3,8	106,7	4,8	108,5	2,5
DbpA (AFZ)	16,4	7,4	16,2	8,6	16,0	7,4
Durchführung	1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 1 Charge		1 Bearbeiter, 8x Bestimmung, 2x Durchführung pro Tag, 3 Tage, 3 Chargen	

VK*: Der VK für RAW-Werte < 20 wurde nicht ermittelt.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*; BUR: *B. burgdorferi s.s.*

Automatisierbarkeit

Proben (n = 96) mit bekannter Antikörperreaktivität wurden manuell sowie mit den Mikrotiterplatten-Prozessoren DS2® (Dynex Technologies; manuelle Probenvorverdünnung) und Thunderbolt® (GSD; Prozessor-durchgeführte Probenverdünnung) abgearbeitet. Aus den gemessenen Farbintensitäten der Spots (RAW) wurde das Bestimmtheitsmaß r^2 für ausgewählte Antikörperreaktivitäten zwischen den einzelnen Methoden der Durchführung ermittelt.

Ig-Isotyp-Nachweis	Dynex DS2® vs. manuelle Abarbeitung		GSD Thunderbolt® vs. manuelle Abarbeitung		Dynex DS2® vs. GSD Thunderbolt® Abarbeitung	
	r^2 IgG	r^2 IgM	r^2 IgG	r^2 IgM	r^2 IgG	r^2 IgM
VisE (AFZ)	0,973	0,952	0,963	0,923	0,968	0,910
p58 (GAR)	0,971		0,947		0,971	
p100 (AFZ)	0,965		0,948		0,954	
OspC (AFZ)	0,955	0,974	0,950	0,908	0,975	0,927
OspC (GAR)		0,971		0,907		0,740
OspC (BUR)		0,966		0,934		0,923
DbpA (GAR)	0,988		0,922		0,967	

r^2 wurde nicht ermittelt, wenn mehr als 90 % der Gesamtzahl (n = 96) der untersuchten Proben keine Antikörperreaktivität für die jeweiligen Antigene zeigten.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*; BUR: *B. burgdorferi* s.s.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *In-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Verdünnungsmedium, Waschpuffer und TMB-Substratlösung. Diese sind Chargen- und Parameter-übergreifend verwendbar.

Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden. Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C. Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten.

Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- **Nicht essen, trinken oder rauchen!**
- **Nie mit dem Mund pipettieren!**
- **Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!**
- **Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2019-11-11	Allgemein	Generelle Überarbeitung
	Testkomponenten	Hinzufügen der S120-Variante
	Vorbereitung und Lagerung der Proben	Veränderung der Probenstabilität
	Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	Haltbarkeit gebrauchsfertiger Waschpuffer

Inkubationsschema SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / IgM

- | | | |
|----|---|---|
| 1. | 
100 µl
30 min

3 x Waschen | Verdünnte Probe (1 : 101)
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 2. | 
50 µl
30 min

3 x Waschen | Konjugat CONJ HRP IgG oder CONJ HRP IgM
Inkubation (Raumtemperatur)
mit Waschlösung, jeweils 400 µl pro Kavität |
| 3. | 
50 µl
30 min

Absaugen | Substratlösung SUBSTR TMB
Inkubation (lichtgeschützt bei Raumtemperatur) |
| 4. | Bildaufnahme der Kavitäten
und Imageanalyse | Scanner Seramun <i>SpotSight</i> ® plate / Seramun
<i>SpotSight</i> ® strip und Software Seramun
<i>SpotSight</i> ® scan |

 Hersteller	 Herstellungsdatum	 Verwendbar bis	LOT Charge	REF Artikelnummer
 Vor Sonnenlicht schützen	 Temperaturbegrenzung	 Biologische Risiken	 Nicht wiederverwendbar	
 Gebrauchsanweisung beachten	 Achtung	IVD <i>In-vitro</i> - Diagnostikum	 Ausreichend für <n> Prüfungen	

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® sind eingetragene Marken der Seramun Diagnostica GmbH.

SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM**

Spotimmunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to
Borrelia burgdorferi sensu lato in human serum or plasma

REF SP-006-10 G-S6 ▽ 48 REF SP-006-10 G-S12 ▽ 96 REF SP-006-10 G-S24 ▽ 2x 96
REF SP-006-10 G-S120 ▽ 10x 96 IVD In-vitro- diagnostic device CE
REF SP-006-10 M-S6 ▽ 48 REF SP-006-10 M-S12 ▽ 96 REF SP-006-10 M-S24 ▽ 2x 96
REF SP-006-10 M-S120 ▽ 10x 96 IVD In-vitro- diagnostic device CE



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 33767 791-10 · fax +49 33767 791-99 · info@seramun.com

Introduction

Lyme borreliosis is a systemic infectious disease with various clinical manifestations. The disease can be divided into 3 stages involving different organ systems. Cardinal symptoms of the first stage (4 to 8 weeks p. i.) are the erythema chronicum migrans and local or general lymphadenopathies (lymphadenosis cutis benigna). The clinical manifestations of the second stage (1 to 12 months p. i.) range from meningitis, meningopolyneuritis, encephalitis up to hemiparesis, myoneuralgia and arthralgia, especially knee joint arthritis. Cardiac manifestations like life-threatening myocarditis / pancarditis are rarely detected. The third stage (months to years p. i.) is characterized by chronic infection of the nervous system (neuroborreliosis, progressive encephalomyelitis), the skin (acrodermatitis chronica atrophicans) and the joints (chronic erosive arthritis). Especially late manifestations of Lyme borreliosis can reduce quality of life and antibiotic treatment is difficult. Therefore an early diagnosis of borrelia infections is of great importance.

The infectious agent of Lyme disease was isolated from ticks in 1982 by BURGDORFER. It belongs to spirochetes and represents the independent genus *Borrelia*. The tick species *Ixodes ricinus* is the main vector of *Borrelia burgdorferi* in Europe. The occurrence of ticks within densely wooded rural areas correlates with the frequency of Lyme disease cases with a peak in the summer and autumn months. While the tick is taking blood from the host the *Borrelia* are transmitted from the contents of a tick's intestine. Persons at risk for *Borrelia* infections are people who work in forestry or agriculture, hunters and campers, soldiers and all people who occasionally spend time in wooded areas. The incidence of Lyme disease reaches from 2 to 40 / 100 000 in middle Germany to 300 / 100 000 in Austria. The estimated number of unrecognized cases is presumably higher, because a tick bite is not always recognized and the typical erythema chronicum migrans only develops in about 50 % of *Borrelia* infections.

The direct detection of the infectious agent via culture from blood, cerebral spinal fluid (CSF) or skin biopsies undoubtedly represents the safest method for diagnosis of Lyme disease. Unfortunately this method is hampered by the long reproduction time of the *Borrelia*, the complexity of the culture medium

and the relatively low sensitivity in case of culture from patient material. Thus culture as well as Borrelia detection from tissue sections via immunohistological methods are not suitable for routine diagnosis. Methods of choice are detection of IgG and/or IgM antibodies via immunofluorescence or enzyme immunoassay (ELISA). The ELISAs use Borrelia sonicates, partially purified or recombinant antigens for plate coating. Because of the regionally differing occurrence of subtypes (genospecies) and the known variability of the cell surface proteins of *Borrelia burgdorferi*, antigen mixtures are often preferred. Confirmatory tests like western blot, dot blot or line assay are essential and the serological test results have to be interpreted together with the clinical picture. Negative test results do not exclude Lyme disease (early stage of infection, seronegative cases).

Literature:

1. Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B.: Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1433-1444
2. Kamradt, T., Krause, A., Priem, S., Burmester, G. R.: Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie, Dt. Ärzteblatt 1998, 95: 214-219
3. Porstmann, T., Labordiagnostik der Borrelieninfektion, in: Talaska, T. (Hrsg.): Symposium Lyme Borreliose: 35-38, DPC Akademie Bad Nauheim 1998
4. Talaska, T., Diagnostische Methoden bei Borrelien-Infektionen - Übersicht, in: Talaska, T. (Hrsg.): Für die Praxis: Lyme-Borreliose, ISBN 3-00-002363-1
5. Tewald, F., und Braun, R.: Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelieninfektion, Clin. Lab. 1998, 44: 897-902
6. Wilske, B., Fingerle, V., Hauser, U. und Rössler, D.: Borrelien, Diagnostische Bibliothek 48: 1-12 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Juni 1997
7. Lawrenz, M. B., Hardham, J. M., Owens, R. T., Nowakowsky, J., Steere, A. C., Wormser, G. P., Norris, S. J.: Human Antibody Responses to VisE Antigenic Variation Protein of *Borrelia burgdorferi*, J. Clin. Microbiol. 1999, 37/12: 3997-4004
8. Liang, T. F., Steere, A. C., Marques A. R., Johnson, B. J. B., Miller J. N., Philipp M. T.: Sensitive and Specific Serodiagnosis of Lyme Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Peptide Based on an Immunodominant Conserved Region of *Borrelia burgdorferi* VisE J. Clin. Microbiol. 1999, 37/12: 3990-3996
9. Peltomaa, M., McHugh, G., Steere, A. C.: The VisE (IR₆) Peptide ELISA in the Serodiagnosis of Lyme Facial Paralysis, Otolaryngology & Neurology 2004, 25: 838-841
10. Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B. J. B., Wilske, B.: Significant Improvement of the Recombinant *Borrelia*-Specific Immunoglobulin G Immunoblot Test by Addition of VisE and a DbpA Homologue Derived from *Borrelia garinii* for Diagnosis of Early Neuroborreliosis, J. Clin. Microbiol. 2003, 41/3: 1299-1303
11. Wilske, B., Zöller, L., Brade, V., Eiffert, H., Göbel, U.B., Stanek, G., Pfister, H.W. (Mitarbeit): Lyme-Borreliose. MiQ 12-2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Urban & Fischer, 2000
12. Wilske, B. et al.: Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1993, 61:2182-2191
13. Goettner, G., Schulte-Spechtel. U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B. and Fingerle, V.: Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VisE and DbpA Homologues. J. Clin. Microbiol. 2005, 43 (8): 3602-3609
14. Simpson W. J., Schrumph, M. E., and Schwan, T.G.: Reactivity of Human Lyme Borreliosis Sera with a 39-Kilodalton Antigen Specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 1990, 28 (6): 1329-1337
15. Rössler, D., Eiffert, H. Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Praec-Mursic, V., Teepe, J., Schlott, T., Soutschek, E.: Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. Med.Microbiol. Immunol. 1995, 184 (1): 23-32
16. Roessler, D., Hauser, U., Wilske, B.: Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 1997, 35 (11): 2752-2758
17. Panelius, J., Lahdenne, P., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Oksi, J. and Seppälä, I.: Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garinii* in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Med. Microbiol. 2002, 51: 731-739
18. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2007, 49: 13-21

Intended use

The **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM** test is an *in vitro* diagnostic device (spotimmunoassay, SIA) for the detection of *Borrelia*-specific IgG or IgM antibodies in human serum or plasma samples.

Principle of the test

The **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM** test is a solid phase immunoassay based on the use of recombinant *Borrelia* proteins as capture antigens printed in array arrangement (spot array) on the bottom of the wells of 96well-microtiter plates. The recombinant antigens serve as capture molecules for antibodies against *Borrelia* antigens. Bound antibodies are detected by horseradish peroxidase-(HRP)-labeled antibodies against human antibodies of IgG- or IgM-type by substrate reaction with hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). At the site of formed immune complexes blue spots are developed by precipitated product from colorless substrate solution. Color intensity correlates to the antibody concentration. Pale blue to dark blue spots are visible by eye.

The test procedure for antibody detection is performed in 3 steps:

Step 1

Incubation of 1 : 101 diluted samples for 30 minutes at room temperature in the intended wells. After incubation samples are aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 2

Incubation of wells with the anti-human IgG- or IgM-HRP-conjugate for 30 minutes at room temperature. After incubation the antibody is aspirated and unbound components are removed by 3 wash cycles with wash solution.

Step 3

Incubation of wells with substrate solution SeramunBlau® spot dark for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by aspirating the substrate solution, followed by tapping the plate/strip dry onto lint-free absorbent paper. The coloring of the developed arrays is stable when stored protected from light.

After finishing step 3, developed assays can be scanned within 24 hours either by using the Seramun *SpotSight®* plate or Seramun *SpotSight®* strip scanner; the obtained images are interpreted by using the Software Seramun *SpotSight®* scan. Taking account of the test-specific evaluation criteria, the test result is determined.

Used Borrelia antigens

Nomenclature*	Properties / Specificity		Relevance	Origin
VlsE (7, 8, 9, 10, 13)	variable major protein-like sequence Expressed	specific	frequently already detectable during early stage, frequently IgG- answer	<i>B. afzelii</i>
p39 (BmpA) (1, 11, 14, 16)	Flagella complex Borrelia membrane protein A	high specific	frequently already detectable during early stage	<i>B. afzelii</i>
p58 (1, 11)	not characterized	specific	frequently in stage 3	<i>B. garinii</i>
p100 (1, 11, 15)	Protein of surface membrane- vesicles	high specific	marker for late infection stage	<i>B. afzelii</i>
p23 (OspC)** (1, 6, 11, 12, 17)	Outer surface protein C	high specific	marker for early stage, frequently IgM-answer	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B.</i> <i>gurgdorferi sensu stricto</i>
p18 (DbpA)** (10, 11, 13)	Outer surface protein, Decorin binding protein A	specific	marker especially for neuroborreliosis and lyme arthritis, IgM- and IgG-answer	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B.</i> <i>burgdorferi sensu stricto</i>

* The nomenclature for some antigens is not consistently used in the literature concerning molecular mass and specificity.

** Each antigen species is printed separately.

Kit components

	For 48 determinations	For 96 determinations	For 2x 96 determinations	For 10x 96 determinations
1	WELLS Wells with arrays 6 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	2x 12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant	10x 12 single breakable 8-well strips in frame vacuum-sealed with desiccant
IgG detection: color coding dark blue; IgM detection: color coding light blue				
2	WASHBUF CONC 10X Wash buffer Seramun® wash buffer A 10-fold	100 ml concentrate transparent bottle, white cap	2x 100 ml concentrate transparent bottle white cap	10x 100 ml concentrate transparent bottle white cap
3	DIL Sample diluent Seramun® sample diluent B	55 ml ready-to-use solution, colored red transparent bottle black cap	4x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap	20x 55 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, black cap
4	CONJ HRP IgG Anti-human IgG- HRP-conjugate or Anti-human IgM- HRP-conjugate	8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap	10x 8 ml ready-to-use solution, colored red, transparent bottle, red cap
5	SUBSTR TMB Substrate SeramunBlau® spot dark 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	8 ml ready-to-use solution, black bottle, blue cap	2x 8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cap	10x 8 ml ready-to-use solution, colored green, transparent bottle, green cap
6	COVER Adhesive film	2x	4x	20x
7	SWAB Swab with 70 % (v/v) Isopropyl alcohol	3x2	12x2	60x2

Preparation and storage of samples

Sample collection should be done in a sterile manner. Serum is separated after clotting by centrifugation as soon as possible. Samples can be stored at 2...8 °C for a maximum of 7 days. For longer storage times samples have to be stored at -20 °C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided!

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. The samples have to be diluted 1 : 101 (10 µl sample and 1000 µl sample dilution buffer) with the ready to use sample diluent.

Materials required but not provided

• Adjustable single-channel micro-pipettes incl. pipette tips • Adjustable multi-channel micro-pipettes incl. pipette tips • Reagent container for multi-channel micro-pipettes • Distilled or deionized water • lint-free absorbent paper • Test tubes (1 ml) for sample dilution • Beaker and measuring cylinder • stop watch • Washer for 96-well microtiter plates (optional) • Collecting devices for infectious material • Seramun *SpotSight*[®] plate or Seramun *SpotSight*[®] strip scanner with evaluation software Seramun *SpotSight*[®] scan

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 1x 48, 1x 96, 2x 96 or 10x 96 determinations. The expiry date of each component is reported on its respective label; that of the complete kit on the outer box label. Upon receipt, all test components have to be kept at 2...8 °C, preferably in the original kit box. After opening all kit components are stable for at least 3 months, provided proper storage. The ready-to-use wash solution can be used up to 4 weeks when stored at 2...8 °C and up to 2 weeks when stored at room temperature.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. The microtitration plate is vacuum-sealed in a foil with desiccant. The plate consists of a frame and strips with breakable wells. Allow the sealed plate to reach room temperature before opening. Unused wells should be stored refrigerated and protected from moisture in the original cover carefully resealed. Prepare a sufficient amount of wash buffer by diluting one part of the wash buffer concentrate **WASHBUF CONC 10X** with 9 parts of distilled or de-ionized water. For Example: 10 ml **WASHBUF CONC 10X** + 90 ml distilled water. The substrate **SUBSTR TMB** must be protected from direct light! The test should not be performed with a substrate solution **SUBSTR TMB** that is colored dark or contains colored precipitates!

Workplace requirements

Processing the spotimmunoassays requires a clean and lint-free workplace. Adhesion of fibers to the plastic surface of the wells has to be avoided. Fibers may disturb optical image generation of arrays and cause erroneous results. Workplace and kit components should not be exposed to direct sunlight.

Assay procedure

Performance at room temperature (18...25 °C) and at the specified incubation times.

For the handling of SeraSpot® tests the use of the starter kit (order number: SP-000-1) is recommended. The kit is designed for multiple use.

Important notes:

- **Avoid any contact or scratching on the bottom surface of the wells by pipet tips or washer needles. This results in irreparable damages of the spot array.**
- **All liquid reagents (sample, conjugate and substrate) have to be pipetted without causing air bubbles into the wells.**
- **Before starting imaging of the wells it is necessary to remove particles or fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells using the swab **[SWAB]** provided in the kit.**
- **Due to the drying of residual liquid, the images may appear more contrast-intensive, which can lead to slight deviations of the measured values during repeated scanning. Evaluation of the individual parameters is not changed!**

Working steps

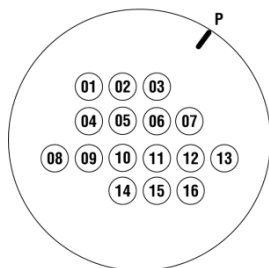
1. Warm all reagents to room temperature (RT) before use. Mix gently without causing foam.
2. Add **100 µl** of 1:101 diluted sample to each well. Preparation of working dilution of the sample e.g. 10 µl serum and 1000 µl sample dilution buffer.
3. Cover plate with adhesive film **[COVER]** and incubate for **30 min** at room temperature.
4. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **[WASHBUF CONC 10X]**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
5. Add **50 µl** of the ready-to-use conjugate solution **[CONJ HRP IgG]** or **[CONJ HRP IgM]** to each well.
6. Cover plate with adhesive film **[COVER]** and incubate for **30 min** at room temperature.
7. Empty wells (aspirate and discard samples), then wash wells **3 x** using **400 µl** wash solution per well (made of **[WASHBUF CONC 10X]**). Tap plate dry onto lint-free absorbent paper.
8. Add **50 µl** of the ready-to-use substrate solution **[SUBSTR TMB]** to each well.
9. Cover plate and protect from light. Incubate for **30 min** at room temperature.
10. Empty wells (aspirate and discard substrate). Tap plate dry onto lint-free absorbent.
11. Clean bottom of wells with Swab **[SWAB]**.
12. Perform image acquisition using the Seramun *SpotSight*® plate or the Seramun *SpotSight*® strip scanner and evaluate the results with the Seramun *SpotSight*® scan software. If image acquisition is performed with the scanner Seramun *SpotSight*® strip, transfer single 8-well microtiter plate strips to the scanners strip holder.

Aspiration and washing steps can be performed manually or via washer for 96-well microtiter plates.

After aspiration of the substrate solution, the color of developed spots is stable for 24 hours when stored the plate in the dark.

Test evaluation

Array layout



Parameter	Controls
04 VlsE (AFZ)	01 Positive control (PC)
05 p39 (AFZ)	02 Cut-off control (CO)
06 p58 (GAR)	03 Negative control (NC)
07 p100 (AFZ)	14 IgG conjugate control (GC)
08 OspC (AFZ)	15 IgM conjugate control (MC)
09 OspC (GAR)	16 Serum control (SC)
10 OspC (BUR)	
11 DbpA (AFZ)	
12 DbpA (GAR)	
13 DbpA (BUR)	
	P Well position marker

Validity criteria for the test

The *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgM test includes the following control spots:

1. Positive control (PC). Intensively stained spot, darker than cut-off control. Always stained.
2. Cut-off control (CO). Weakly stained spot. Used for result evaluation of parameter specific signals.
3. Negative control (NC). Pale spot with intensity lower than Cut-off control
4. IgG, IgM conjugate control (GC, MC). Intensively stained spots with different position for IgG and IgM antibody detection. Serving as antibody isotype control.
5. Serum control (SC). Intensively stained spot always stained in presence of sample. Absence of spot indicates absence of sample.

The test cannot be evaluated if one of the validity criteria listed in points 1 to 5 is not fulfilled.

Result interpretation

Evaluation of the test has to be performed by using the Seramun *SpotSight*® scan software. A visual plausibility check is possible with the aid of the magnifying lens contained in the starter kit (order number: SP-000-1).

Judgment of spot staining is performed in accordance with the MIQ guidelines (12) as follows:

Result Interpretation	IgG	IgM
negative	max. 1 antigen spot * (except VlsE-Spot) > Cut-off control	no antigen spot > Cut-off control
borderline	VlsE-Spot > Cut-off control	1 antigen spot* (except OspC*) > Cut-off control
positive	2 or more antigen spots * > Cut-off control	OspC* spot(s) or 2 other antigen spots* > Cut-off control

* Several OspC spots count as 1 spot / several DbpA spots count as 1 spot

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. Impurities and cross contamination of reagents or samples by fungi or bacteria can lead to false positive as well as false negative results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples (concentrations up to 500 mg/dl hemoglobin, 1000 mg/dl lipids and 20 mg/dl bilirubin C / bilirubin F) do not interfere with the test. Rheumatoid factors may influence the results.

Assay procedure

Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the wells or incorrect timing can produce erroneous results.

Air bubbles generated by too forceful pipetting of samples and/or reagents cause uneven signal formation of arrays. These arrays cannot be used for evaluation.

Damaged arrays e.g. by scratching the well bottom with pipet tips or washer needles are not suitable for evaluation.

Any kind of fibers which may adhere to the underside of the bottom of the wells or to the array area cause erroneous results.

Performance characteristics

Diagnostic sensitivity

1. Investigation of serologically pre-determined samples

Serologically pre-determined samples (n = 370 (IgG determination), n = 370 (IgM determination), reference test 1) of patients with suspect of Borreliosis were tested in the *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgM test ("Initial sensitivity"). Samples with discrepant results were retested in a second assay for detection of anti-*Borrelia* antibodies. The results obtained in the reference test 2 were used for determination of the final status of the samples with discrepant results ("Amended sensitivity").

IgG		Reference test 1		
		positive (n = 205)	borderline (n = 7)	negative (n = 158)
<i>SeraSpot</i> ® Anti-Borrelia-10 IgG	positive	193	4	11
	borderline	7	1	9
	negative	5	2	138

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **96.7 %**

Amended sensitivity: **98.2 %**

IgM		Reference test 1		
		positive (n = 160)	borderline (n = 2)	negative (n = 208)
<i>SeraSpot</i> ® Anti-Borrelia-10 IgM	positive	151	0	22
	borderline	0	1	8
	negative	9	1	178

Borderline samples were valued positive.

Initial sensitivity: **93.8 %**

Amended sensitivity: **97.2 %**

Diagnostic specificity

A total of 150 predetermined blood donors (Reference test 1) were tested in the *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*® Anti-Borrelia-10 IgM test. Samples with discrepant results were retested and assessed as described in “Diagnostic sensitivity”.

IgG		Reference test 1		
		positive (n = 4)	borderline (n = 0)	negative (n = 146)
SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG	positive	3	0	2
	borderline	0	0	1
	negative	1	0	143

Borderline samples were valued positive.

Initial specificity: **97.9 %**

Amended specificity: **98.6 %**

IgM		Reference test 1		
		positive (n = 4)	borderline (n = 0)	negative (n = 146)
SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM	positive	4	0	0
	borderline	0	0	0
	negative	0	0	146

Borderline samples were valued positive.

Specificity: **100.0 %**

Cross-reactivity

Potential cross-reacting samples were tested in the *SeraSpot*[®] Anti-Borrelia-10 IgG / *SeraSpot*[®] Anti-Borrelia-10 IgM test, and retested in a reference test for detection of anti-*Borrelia* antibodies. Samples with discrepant results were retested and assessed as described in "Diagnostic sensitivity".

<i>SeraSpot</i> [®]	EBV (n = 23)	IgG, Reference test 1			IgM, Reference test 1		
		positive (n = 1)	borderline (n = 0)	negative (n = 22)	positive (n = 2)	borderline (n = 0)	negative (n = 21)
	positive	1	0	0	1	0	0
	borderline	0	0	0	0	0	1
	negative	0	0	22	1	0	20
<i>SeraSpot</i> [®]	Borderline samples were valued positive.						
		Specificity: 100.0 %			Initial Specificity: 95.2 %		
					Amended Specificity: 100.0 %		
<i>SeraSpot</i> [®]	Rheumatic factor (n = 30)	IgG, Reference test 1			IgM, Reference test 1		
		positive (n = 0)	borderline (n = 0)	negative (n = 30)	positive (n = 0)	borderline (n = 0)	negative (n = 30)
	positive	0	0	0	0	0	0
	borderline	0	0	0	0	0	0
	negative	0	0	30	0	0	30
<i>SeraSpot</i> [®]	Borderline samples were valued positive.						
		Specificity: 100.0 %			Specificity: 100.0 %		
<i>SeraSpot</i> [®]	Autoimmune (n = 51)	IgG, Reference test 1			IgM, Reference test 1		
		positive (n = 3)	borderline (n = 0)	negative (n = 48)	positive (n = 2)	borderline (n = 0)	negative (n = 49)
	positive	3	0	0	2	0	1
	borderline	0	0	1	0	0	2
	negative	0	0	47	0	0	46
<i>SeraSpot</i> [®]	Borderline samples were valued positive.						
		Initial Specificity: 97.9 %			Initial Specificity: 93.9 %		
		Amended Specificity: 100.0 %			Amended Specificity: 95.8 %		
<i>SeraSpot</i> [®]	Syphilis (n = 48)	IgG, Reference test 1			IgM, Reference test 1		
		positive (n = 2)	borderline (n = 0)	negative (n = 46)	positive (n = 2)	borderline (n = 0)	negative (n = 46)
	positive	2	0	0	2	0	1
	borderline	0	0	0	0	0	1
	negative	0	0	46	0	0	44
<i>SeraSpot</i> [®]	Borderline samples were valued positive.						
		Specificity: 100.0 %			Initial Specificity: 95.7 %		
					Amended Specificity: 95.7 %		

Investigation of sera from pregnant women

SeraSpot®	Pregnancy (n = 50)	IgG, Reference test 1			IgM, Reference test 1		
		positive (n = 3)	borderline (n = 0)	negative (n = 47)	positive (n = 2)	borderline (n = 3)	negative (n = 45)
	positive	0	0	0	2	0	1
	borderline	0	0	0	0	0	4
	negative	3	0	47	0	3	40
	Borderline samples were valued positive.						
		Specificity: 100.0 %			Specificity: 88.9 %		
				Amended Specificity: 88.9 %			

Precision

Samples of known antibody titer were assayed by SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgM test. Color intensity (RAW) of spots was recorded and the coefficients of variation (CV) were calculated.

IgG detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [x̄] n = 8	CV* [%]	RAW [x̄] n = 48	CV* [%]	RAW [x̄] n = 144	CV* [%]
VisE (AFZ)	153.3	1.5	151.8	1.7	154.5	2.0
p39 (AFZ)	114.2	2.7	111.6	4.9	117.4	6.8
p58 (GAR)	143.0	2.8	145.5	3.0	154.4	6.0
p100 (AFZ)	53.3	5.4	50.5	8.2	55.8	8.9
OspC (AFZ)	34.9	4.9	34.2	5.4	35.5	4.0
DbpA (AFZ)	159.9	1.2	165.3	2.4	167.4	3.0
Procedure	1 operator, 8x determination, 1 batch		1 operator, 8x repeat determinations, 2x testing per day, 3 days, 1 batch		1 operator, 8x repeat determinations, 2x testing per day, 3 days, 3 batches	

CV*: The CV for RAW-values < 20 has not been determined.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*

IgM detection						
	Intra-assay CV		Inter-assay CV		Interbatch CV	
	RAW [x̄] n = 8	CV* [%]	RAW [x̄] n = 48	CV* [%]	RAW [x̄] n = 144	CV* [%]
OspC (AFZ)	103.5	5.8	108.5	2.1	107.1	2.6
OspC (GAR)	105.4	3.5	107.8	3.8	108.1	2.2
OspC (BUR)	109.2	3.8	106.7	4.8	108.5	2.5
DbpA (AFZ)	16.4	7.4	16.2	8.6	16.0	7.4
Procedure	1 operator, 8x determination, 1 batch		1 operator, 8x repeat determinations, 2x testing per day, 3 days, 1 batch		1 operator, 8x repeat determinations, 2x testing per day, 3 days, 3 batches	

CV*: The CV for RAW-values < 20 has not been determined.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*; BUR: *B. burgdorferi* s.s.

Automation

Samples (n = 96) of known antibody titer (IgG and IgM) were assayed manually or by use of the microplate processors DS2® (Dynex Technologies; manual sample dilution) and Thunderbolt® (GSD; processor-performed sample dilution). Color intensity (RAW) of spots was recorded and used for calculation of the coefficient of determination r^2 for selected antibody reactivities and the different methods of operation.

Ig-isotype detection	Dynex DS2® vs. manual processing		GSD Thunderbolt® vs. manual processing		Dynex DS2® vs. GSD Thunderbolt® processing	
	r^2 IgG	r^2 IgM	r^2 IgG	r^2 IgM	r^2 IgG	r^2 IgM
VisE (AFZ)	0.973	0.952	0.963	0.923	0.968	0.910
p58 (GAR)	0.971		0.947		0.971	
p100 (AFZ)	0.965		0.948		0.954	
OspC (AFZ)	0.955	0.974	0.950	0.908	0.975	0.927
OspC (GAR)		0.971		0.907		0.740
OspC (BUR)		0.966		0.934		0.923
DbpA (GAR)	0.988		0.922		0.967	

r^2 was not determined if more than 90 % of the total number (n = 96) of the samples showed no antibody reactivity for the particular antigens.

AFZ: *B. afzelii*; GAR: *B. garinii*; BUR: *B. burgdorferi s.s.*

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The kit should be performed by trained technical staff only. The test instructions have to be followed strictly. The expiration dates stated on the respective labels are to be observed. Do not use reagents from damaged packages or bottles.

Do not use or mix reagents from different lots except for sample diluent, washing buffer and TMB substrate solution. These can be used across batches and parameters.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8 °C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

In particular the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2019-11-11	General	General revision
	Kit components	Adding of S120 version
	Preparation and storage of samples	Change of stability of samples
	Preparation and storage of reagents	Expiry of ready-to-use wash solution

Incubation scheme **SeraSpot® Anti-Borrelia-10 IgG / IgM**

1.  100 µl
30 min
 3 x wash
diluted sample (1 : 101)
incubation (room temperature)
with washing solution, each 400 µl per well
2.  50 µl
30 min
 3 x wash
conjugate **CONJ HRP IgG** or **CONJ HRP IgM**
incubation (room temperature)
with washing solution, each 400 µl per well
3.  50 µl
30 min
 aspiration
substrate **SUBSTR TMB**
incubation (room temperature, protected from light)
4. imaging of wells and image analysis
scanner Seramun *SpotSight*® plate / Seramun *SpotSight*® strip and software Seramun *SpotSight*® scan

	Manufacturer		Date of manufacture		Use by		Batch code		Catalog number
	Keep away from sunlight		Temperature limits		Biological risks		Do not reuse		
	Consult instructions for use		Caution		In-vitro-diagnostic medical device		Contains sufficient for <n> tests		

SeramunBlau®, SeraSpot® und Seramun SpotSight® are registered trademarks of Seramun Diagnostica GmbH.