



EIASON[®] Borrelia IgM



Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in human Serum, Plasma (Citrat, Heparin) oder Liquor

Anleitung

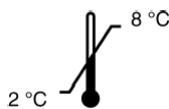
Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von







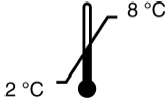











IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-113
Email: order@iason.eu
www.iason.eu

REF E11-007-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Mikrotiterplatte
	Bestellnummer		Cut Off Kontrolle
	Hergestellt von		Negative Kontrolle
	Lagerung bei		Positive Kontrolle
	Europäische Konformität		Waschpuffer Konzentrat
	Verwendbar bis		Substrat
	Chargenbezeichnung		Stopplösung
	Enzymkonjugat		Probenver- dünnungspuffer

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Der EIASON® Borrelia IgM Kit ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Borrelia burgdorferi in humanem Serum, Plasma (Citrat, Heparin) und Liquor bestimmt.

Der Nachweis intrathekal gebildeter IgG- und IgM-Antikörper gegen Borrelien wird beim klinischen Verdacht auf Neuroborreliose empfohlen. Hierfür werden Serum-Liquor-Paare parallel in einem quantifizierbaren EIASON® Borrelia IgG/ IgM ELISA untersucht. Das Ergebnis kann anschließend über einen Blot abgesichert werden.

Serum und Liquor werden zuerst beim üblichen Borrelien-Screening gemessen. Für die Bestimmung des Antikörperindex (AI) müssen bei positiven Liquores die Werte

für das Gesamt-IgG und/ oder -IgM, sowie Albumin für Serum und Liquor angefordert werden.

Der Borrelien-spezifische AI ermöglicht die Unterscheidung zwischen intrathekal gebildeten Antikörpern und solchen, die die Blut-Liquor-Schranke passiv überschritten haben. Über den Grenzwert QLim aus dem Quotientendiagramm nach Reiber wird sichergestellt, dass bei einer polyspezifischen intrathekalen Immunreaktion keine falsch negativen Antikörperindex-Werte errechnet werden.

Bei Serum-Liquor-Paaren mit einem pathologisch erhöhten AI im Screening empfiehlt sich die Bestätigung mittels Blot.

Zusammenfassung

Spirochäten sind spiralig gekrümmte, im Vergleich zu ihrem Durchmesser (0,1-3µm) unproportional lange (bis 250 µm) gram-negative Bakterien. Alle pathogenen Spezies gehören zur Familie der Treponemataceae, zu denen folgende Gattungen zählen: Treponema, Borrelia und Leptospira. Die Treponemen sind schlanke, biegsame Bakterien gewöhnlich in charakteristischer Spiralf orm.

Borrelien sind zarte (0,2-0,5 µm), relativ lange (bis 250 µm) Spirochäten, mit 3-10 ungleichmäßigen Windungen.

Borrelia burgdorferi, der Verursacher der Borreliose-Erkrankung (Lyme-Erkrankung), wird hauptsächlich durch Zecken übertragen, möglicherweise auch durch andere blutsaugende Insekten. Hauptvektor in Europa ist die Schildzecke *Ixodes ricinus*, in den USA *Ixodes damini*.

Außer *B. burgdorferi* verursachen auch *B. garinii* und *B. afzelii* Lyme-Borreliosen. Die Erkrankung verläuft klassischerweise in drei Stadien. Sie wurde 1975 in der Kleinstadt Lyme im US-Bundesstaat Connecticut beschrieben. Burgdorfer et al. konnten 1983 den Erreger erstmals isolieren.

Die Lyme-Borreliose ist eine weit verbreitete Krankheit. Eine echte Prophylaxe existiert nicht. Ca. 10-20 % der Zecken in Europa sind mit *Borrelia burgdorferi* durchseucht. Die Erkrankungen an Borreliose sind endemisch und treten z.B. in Süddeutschland, entlang von Flussläufen und im Einzugsgebiet großer Städte gehäuft auf. Den natürlichen Lebensraum stellen vor allem bewaldete, feucht-warme Regionen Nordamerikas, Europas, Nordafrikas, Australiens und Japans dar.

Saisonale Gipfel akuter Erkrankungen sind die Monate Juni bis September, weitgehend erkrankungsfreie Monate Januar bis März.

Bevorzugter Personenkreis sind Waldarbeiter, Förster, Jäger und in der Landwirtschaft tätige Personen.

Bedingt durch die Vielzahl möglicher uncharakteristischer Symptome (neurologische, dermatologische, kardiale, rheumatische Manifestationen möglich) ist die Diagnose der Lyme-Borreliose häufig schwer und erfolgt erst relativ spät.

Nur die frühzeitige Diagnosestellung jedoch ermöglicht eine effiziente Kontrolle der Erkrankung mittels Antibiotika, in der chronischen Phase sind die Borrelien nahezu unangreifbar.

Spezies	Erkrankung	Symptome (z.B.)	Infektionsweg
Borrelia burgdorferi	Lyme-Borreliose	Multisystemerkrankung Frühmanifestation: Erythema migrans; grippeähnliche Symptome wie Fieber, Myalgien und Kopfschmerzen; Karditis; Meningitis Spätmanifestationen: Chronische neurologische, dermatologische und/oder kardiologische Symptome; Akrodermatitis chronica atrophicans; Herxheimer Reaktion; Lyme arthritis	Übertragung durch Zeckenstich. Europa: Ixodes ricinus USA: Ixodes damini

Nachweis des Erregers bzw. der Infektion durch:

- Mikroskopie
- PCR
- Serologie: z.B. ELISA

Messprinzip

Die qualitative immunoenzymatische Bestimmung von spezifischen Antikörpern beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Die Mikrotiterplatten sind mit spezifischen Antigenen beschichtet, an welche die korrespondierenden Antikörper aus der Probe binden. Ungebundenes

Probenmaterial wird durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Meerettich-Peroxidase (HRP) Konjugates. Dieses Konjugat bindet an die an der Mikrotiterplatte gebundenen spezifischen Antikörper. In einem zweiten Waschschriff wird ungebundenes Konjugat entfernt. Die Immunkomplexe, die durch die Bindung des Konjugates entstanden sind, werden durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung und eine resultierende Blaufärbung nachgewiesen.

Die Intensität des Reaktionsproduktes ist proportional zur Menge der spezifischen Antikörper in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON® Borrelia IgM Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist) haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Unser Produzent prüft humanes Rohmaterial, dass in diesem Kit zum Einsatz kommt auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit

ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma IASON GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Testkit bei 2 - 8°C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2-8°C gelagert werden.

Lagerung und Vorbereitung der Partientenproben

Es sollten humane Serum, Plasma- (Citrat, Heparin) und Liquorproben verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70 – -20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor dem Verdünnen gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden! Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

Die Probenentnahmen von Serum und Liquor müssen am selben Tag erfolgen. Beide Probenarten müssen immer parallel in einem Testlauf gemessen werden. Doppelbestimmung wird empfohlen.

Probenverdünnungen

Serum 1:101 Die Kontrollen des ELISA Kits werden unverdünnt gemessen. Die Patientenproben werden 1:101 mit **DIL** verdünnt. Gut mischen! Sowohl von den gebrauchsfertigen Kontrollen als auch von den verdünnten Proben werden 100 µL in die entsprechenden Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

Liquor 1:2 Es werden jeweils 50 µL **DIL** direkt in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Dann werden 50 µL Liquor zugegeben und durch mehrmaliges Wiederaufziehen der Pipette gemischt. Reihenfolge beachten!

Kitbestandteile

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen.

1. **MPL** Borrelia burgdorferi beschichtete Mikrotiterplatte (IgM): 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit rekombinanten Borrelia burgdorferi Antigenen; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2-8°C lagern.
2. **DIL** IgM -Probenverdünnungspuffer: 1 Flasche mit 100 mL Phosphatpuffer (10mM) zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
3. **STOP** Stopplösung; 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0.2 mol/l, gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
4. **WASH** Waschlösung (20x konz.): 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0.2M) zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe. Der Waschpuffer ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL Waschpuffer + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur (20-25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.
5. **CONJ** B. burgdorferi anti-IgM-Konjugat: 1 Flasche mit 20 mL Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgM in Phosphatpuffer (10mM); rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
6. **SUB** Substrat; 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5`-Tetramethylbenzidin (TMB), <0.1%; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe. <5% NMP. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2- 8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. Die Lösung ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte die TMB-Substratlösung blau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.
7. **PC** B. burgdorferi IgM Positivkontrolle: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig
8. **CUTOFF** B. burgdorferi IgM Cut-off Kontrolle: 1 Fläschchen mit 3 mL Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
9. **NC** B. burgdorferi IgM Negativkontrolle: 1 Fläschchen mit 2 mL Kontrolle (humanes Serum oder Plasma); gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

Erforderliches Zubehör

- Mikrotiterplatten- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37°C
- Manuelle oder automatische Waschanlage
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10- 1000 µL)
- Vortex-Mischer

- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Destilliertes Wasser
- Timer

Testdurchführung

Allgemeine Information

1. Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
2. Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden. Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
3. Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
4. Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
5. Jeder Lauf muss eine Standardkurve und die Kontrollproben beinhalten.

Testdurchführung

Gebrauchsinformation **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen.

Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, die Zahl der Waschschriffe von drei auf fünf und das Volumen der Waschlösung von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen.

Vor Testbeginn auf dem mitgelieferten Plattenlayout die Verteilung bzw. Position der Proben und Standards auf **MPL** genau festlegen. Die benötigte Anzahl von **MPL** in den Streifenhalter einsetzen.

Inkubator auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ einstellen.

1. Je 100 µL **NC** **PC** **CUTOFF** und vorverdünnte Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Vertiefung A1 ist für den Substratleerwert vorgesehen.
2. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
3. **1 h ± 5 min bei 37°C inkubieren.**
4. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300 µL **WASH** waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte mindestens

5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fliesspapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.

Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!

5. 100 µL **CONJ** in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes A1 vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
6. **30 min bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
7. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
8. 100 µL **SUB** in alle Vertiefungen pipettieren.
9. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
10. In alle Vertiefungen 100 µL **STOP** in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der **SUB** Zugabe pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
11. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der **STOP** messen

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Gladiator**
- **IASON® Quardette**

Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes den Nullabgleich des Mikrotiterplatten-Photometers vornehmen.

Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert des Substratleerwertes von allen anderen Extinktionswerten subtrahiert werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen! Extinktion aller Kavitäten bei 450 nm messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben in das Plattenlayout eintragen.

Eine bichromatische Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen. Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den Mittelwert der Extinktionswerte berechnen.

Ergebnisberechnung

Testgültigkeitskriterien

Der Test wurde richtig durchgeführt, wenn er folgende Kriterien erfüllt:

- Substrat-Leerwert: Extinktionswert < 0,100
- **NC**: Extinktionswert < 0,200 und < **CUTOFF**
- **CUTOFF**: Extinktionswert 0,150 – 1,300
- **PC**: Extinktionswert > **CUTOFF**

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

Messwertberechnung

Der **CUTOFF** ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden **CUTOFF** Kontrollen.

$$\text{Beispiel: } 0,44 \text{ OD } \text{CUTOFF} + 0,42 \text{ OD } \text{CUTOFF} = 0,86 : 2 = \underline{0,43}$$

$$\text{CUTOFF} = \underline{0,43}$$

Ergebnisse in IASON arbiträren Einheiten [IAU]

$$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{CUTOFF}} = [\text{IASON arbiträren Einheiten} = \text{IAU}]$$

$$\text{Beispiel: } \frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ IAU}$$

Interpretation der Ergebnisse

Cut-off	10 IAU	
Positiv	> 11 IAU	Es liegen Antikörper gegen den Erreger vor. Ein Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) hat stattgefunden.
Grenzwertig	9 – 11 IAU	Antikörper gegen den Erreger können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut im grenzwertigen Bereich, gilt die Probe als negativ .
Negativ	< 9 IAU	Es liegen keine Antikörper gegen den Erreger vor. Ein vorausgegangener Kontakt mit dem Antigen (Erreger bzw. Impfstoff) ist unwahrscheinlich.

Die Diagnose einer Infektionskrankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den serologischen Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Bei Immunsupprimierten und Neugeborenen besitzen die Ergebnisse serologischer Tests nur einen begrenzten Wert.

Antikörper- Isotypen und Infektionsstatus

Serologie	Bedeutung
IgM	Typisch für Primärantwort Hoher IgM-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgG-Titer: → Hinweis auf relativ frische Infektion Selten: → persistierendes IgM
IgG	Typisch für Sekundärantwort Können auch noch nach Jahren nachweisbar sein Hoher IgG-Titer bei gleichzeitig niedrigem IgM-Titer: → wahrscheinlich länger zurückliegende Infektion

Auswertung der Liquor-Proben

Berechnung der Schwellenwerte für die qualitative Bewertung der Proben:

IgM Serum: Schwellenwert = Extinktion der **CUTOFF** = 10 IAU

IgM Liquor: Schwellenwert = 0,5 x Extinktion **CUTOFF** = 5 IAU

Interpretation der Ergebnisse

IgM Ergebnis	Interpretation und weitere Maßnahmen
Extinktion _{Serum} 1:101 < Schwellenwert Serum oder OD _{Serum} /OD CUTOFF < 10 IAU und Extinktion _{Liquor} 1:2 < Schwellenwert Liquor oder OD _{Liquor} /OD CUTOFF < 5 IAU	Keine spezifischen IgM-Antikörpern im Serum vorhanden Keine spezifischen IgM-Antikörpern im Liquor vorhanden Kein Hinweis auf Neuroborreliose Keine Bestimmung des Antikörperindex (AI) IgM
Extinktion _{Serum} 1:101 ≥ Schwellenwert Serum oder OD _{Serum} /OD CUTOFF ≥ 10 IAU und Extinktion _{Liquor} 1:2 < Schwellenwert Liquor OD _{Liquor} /OD CUTOFF < 5 IAU	spezifischen IgM-Antikörpern im Serum vorhanden Keine spezifischen IgM-Antikörpern im Liquor vorhanden Hinweis auf eine frische Infektion Kein Hinweis auf Neuroborreliose Keine Bestimmung des Antikörperindex (AI) IgM
Extinktion _{Serum} 1:101 < Schwellenwert Serum oder OD _{Serum} /OD CUTOFF < 10 IAU und Extinktion _{Liquor} 1:2 ≥ Schwellenwert Liquor oder OD _{Liquor} /OD CUTOFF ≥ 5 IAU	Keine spezifischen IgM-Antikörpern im Serum vorhanden Spezifische IgM-Antikörper im Liquor vorhanden Vorliegen einer Neuroborreliose möglich Bestimmung des Antikörperindex (AI) IgM
Extinktion _{Serum} 1:101 ≥ Schwellenwert Serum OD _{Serum} /OD CUTOFF ≥ 10 IAU und Extinktion _{Liquor} 1:2 ≥ Schwellenwert Liquor oder OD _{Liquor} /OD CUTOFF ≥ 5 IAU	Spezifische IgM-Antikörper im Serum vorhanden Spezifische IgM-Antikörper im Liquor vorhanden Vorliegen einer Neuroborreliose möglich Bestimmung des Antikörperindex (AI) IgM

Beim Vorliegen eines negativen Liquor-Ergebnisses im IgG und IgM, wird die Untersuchung an dieser Stelle beendet, da der AI nicht bestimmt werden kann. Liegt das Ergebnis für den Liquor im IgG und/oder IgM oberhalb des Schwellenwertes wird gemäß der Anleitung fortgefahren.

Berechnung des spezifischen IgM in IAU/mL

Für die Berechnung des spezifischen IgM müssen die Extinktionswerte von Serum und Liquor $\leq 2,500$ sein.

Sollte der Extinktionswert für Serum oder Liquor größer als 2,500 sein, muss das Serum-Liquor-Paar verdünnt und erneut in einem Lauf parallel gemessen werden. Folgende Verdünnungen werden empfohlen:

Extinktion	Verdünnung Serum	Verdünnung Liquor (Ansatz in der Kavität)	
Standard Verdünnung	1:101	1:2	50 μ L DIL + 50 μ L Liquor

Ergebnis Standardverdünnung (Extinktion):	Empfehlung für weiterführende Verdünnungen:	Verdünnung Liquor (Ansatz in der Kavität)	
Extinktion $\leq 2,500$	Keine weitere Verdünnung		
$2,500 < \text{Extinktion} \leq 3,000$	1:500	1:5	80 μ L DIL + 20 μ L Liquor
Extinktion $> 3,000$	1:1000; 1:2000; 1:4000	Verdünnung im Röhrchen (aus Polypropylen = PP) 1:10; 1:20; 1:40	

Das anti-Borrelia spezifische IgM wird aus Extinktionswerten für Serum und Liquor $\leq 2,500$ berechnet. Beim Vorliegen mehrere Werte in diesem Bereich (durch Verdünnungen) wird die Extinktion gewählt, die am nächsten an 1,000 liegt.

Achtung: Als cut-off muss in dieser Formel für Serum und Liquor der Wert der CUTOFF (nicht der Schwellenwert) der IgM-Bestimmung verwendet werden.

$$(1.1) \quad \text{Spez. IgM Serum [IAU/mL]} = \text{Extinktion}_{\text{Serum}} \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor/cut-off} \times 101$$

$$(1.2) \quad \text{Spez. IgM Liquor [IAU/mL]} = \text{Extinktion}_{\text{Liquor}} \times 10 \times \text{Verdünnungsfaktor/cut-off} \times 101$$

Berechnung des spezifischen. IgM – Quotienten (Qspez IgM)

$$(2) \quad Q_{\text{spez}} (\text{IgM}) = \text{spez. IgM Liquor [IAU/mL]} / \text{spez. IgM Serum [IAU/mL]}$$

Berechnung der Quotienten QIgM, QAlb

Gesamt-IgM und Albumin müssen mit einer geeigneten Methode jeweils in Serum und Liquor bestimmt werden. Mit den ermittelten Werten werden die folgenden Quotienten bestimmt:

$$(3) \quad \text{IgM-Quotient } Q_{\text{IgM}} = \text{IgM Konz. Liquor} / \text{IgM Konz. Serum}$$

$$(4) \quad \text{Albuminquotient } Q_{\text{Alb}} = \text{Albumin Konz. Liquor} / \text{Albumin Konz. Serum}$$

Berechnung der Grenzwerte QLim (IgM)

$$(5) \quad Q_{\text{Lim}} (\text{IgM}) = 0,67 \times \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7,1 \times 10^{-3}$$

Berechnung des Antikörperindex (AI)

Die Werte für QIgM und QLim (IgM) werden verglichen und der AI (IgM) nach Formel berechnet:

$$(6) \quad \text{Wenn } Q_{\text{IgM}} < Q_{\text{Lim}} (\text{IgM}): \quad \mathbf{AI} (\text{IgM}) = Q_{\text{spez}} (\text{IgM}) / Q_{\text{IgM}}$$

$$(7) \quad \text{Wenn } Q_{\text{IgM}} > Q_{\text{Lim}} (\text{IgM}): \quad \mathbf{AI} (\text{IgM}) = Q_{\text{spez}} (\text{IgM}) / Q_{\text{Lim}} (\text{IgM})$$

Bewertung der AI-Werte

$0,6 < AI \leq 1,3$ (IgM) normal

$1,3 < AI < 1,5$ (IgM) grenzwertig

$AI (IgM) \geq 1,5$ pathologisch

AI-Werte $< 0,6$ sind ein Hinweis auf einen analytischen Fehler (z.B. klinische Chemie). Es sollte überprüft werden, ob Serum und Liquor vom gleichen Tag stammen bzw. ob eine Probenverwechslung ausgeschlossen ist. Eine wiederholte Bestimmung der klinischen Chemie und/ oder der spezifischen Antikörper kann sinnvoll sein.

Im Normalbereich (AI-Werte zwischen 0,6 und 1,3) ist eine intrathekale Antikörpersynthese unwahrscheinlich. Die im Liquor nachgewiesenen spezifischen Antikörper sind aus dem Serum passiv über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquorraum gelangt.

AI-Werte zwischen 1,3 und 1,5 liegen im Graubereich. Das Serum-Liquor-Paar sollte entweder erneut getestet werden oder bei entsprechender klinischer Fragestellung in zeitlichem Abstand ein neues Serum-Liquor-Paar untersucht werden.

AI-Werte $\geq 1,5$ gelten als pathologisch. Sie stellen einen Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper dar, wie sie bei Neuroborreliose nachzuweisen sind.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen.

Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Testcharakteristik

Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt > 90 % für Liquor-Proben und 98,35% (95% Konfidenzintervall: 95,84% - 99,55%) für Serumproben.

Diagnostische Sensivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt > 90 % für Liquor-Proben und 92,45% (95% Konfidenzintervall: 81,79% - 97,91%) für Serumproben.

Präzision

Intra-Assay(n=24)			Inter-Assay (n=12)		
Probe	MW (OD)	VK %	Probe	MW (IAU)	VK %
1	0,451	4,58	1	26,33	11,26
2	1,172	7,76	2	39,3	8,31
3	1,840	10,22	3	6,38	12,82

Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/mL für Hämoglobin, von 5 mg/mL Triglyceride und von 0,5 mg/mL für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden EIASON® Borrelia IgG.

Hinweis: Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

Grenzen des Verfahrens

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

Durch den Einsatz von rekombinanten Antigenen sind Kreuzreaktionen mitfolgenden Erregern weitestgehend ausgeschlossen:

- Treponema pallidum
- Borrelia recurrentis
- Leptospira

Eine Syphilis-Infektion sollte ausgeschlossen werden, da vereinzelt Antikörper gegen p41i auftreten können.

Rechtliche Grundlagen

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma IASON GmbH in Verbindung.

Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in „Zuverlässigkeit der Ergebnisse“ genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt „Therapeutische Konsequenzen“ erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

Literatur

1. Asbrink, Eva; Hovmark, Anders (1988): Early and late cutaneous manifestations in Ixodes-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). In *Annals of the New York Academy of Sciences* 539, pp. 4–15.
2. Barbour, Alan G. (2006): Relapsing Fever and Other Borrelia Diseases. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 499–510.
3. Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V. (2011): Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose. Leitlinien der Deutschen Borreliose-Gesellschaft.
4. Johnson, Russell C.; Schmid, George P.; Hyde, Fred W.; Steigerwalt, A. G.; Brenner, Don J. (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov. Etiologic Agent of Lyme Disease. In *International journal of systematic bacteriology* 34 (4), pp. 496–497. DOI: 10.1099/00207713-34-4-496.
5. Karlsson, Mats; Hovind-Hougen, Kari; Svenungsson, Bo; Stiernstedt, Göran (1990): Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. In *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3), pp. 473–479.
6. Luther, Birgit; Moskophidis, Matthäus (1990): Antigenic cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum*, and *Treponema phagedenis*. In *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 274 (2), pp. 214–226.
7. Magnarelli, Louis A.; Fikrig, Erol; Padula, Steven J.; Anderson, John F.; Flavell, Richard A. (1996): Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. In *Journal of Clinical Microbiology* 34 (2), pp. 237–240.
8. Preac-Mursic, V.; Wilske, Bettina; Schierz, G. (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 263 (1-2), pp. 112–118.
9. Wilske, Bettina; Preac-Mursic, V.; Fuchs, R.; Schierz, G. (1990): Diagnostik der Lyme Borreliose. Diagnose und Labor. In *Laboratoriumsblätter* 40, pp. 24–36.

Arbeitsschema

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

1. Vorverdünnen	1 Teil Serum bzw. Plasmaprobe + 100 Teile von DIL	50 µL DIL + 50 µL von Liquor
2. Pipettieren	Vertiefung A1 für Blank freilassen NC PC CUTOFF vorverdünnte Probe 100µL	
3. Inkubieren	1 Std. bei 37°C	
4. Waschen	3 x waschen: Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 300 µL* WASH pipettieren Waschlösung absaugen oder dekantieren, auf Zellstoff abtropfen	
5. Pipettieren	CONJ außer Blank	100µL
6. Inkubieren	30 min bei Raumtemperatur (20-25°C)	
7. Waschen	3 x waschen: siehe Punkt 4	
8. Pipettieren	SUB	100µL
9. Inkubieren	15 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25°C)	
10. Pipettieren	STOP	100µL
11. Messen	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Faktor 3 (Photometer abhängig), messen innerhalb von 30 min. Auswertung: Mittlere Extinktion der Patientenprobe x 10/ CUTOFF = IAU	

* Bitte, erhöhen Sie das Volumen von **WASH** auf 350 µL, falls erforderlich.

Normalwerte

Serum und Plasmaproben		Antikörper Index IgM*	
	IAU		
Cut Off	10		
Grauzone	9 - 11	normal	0,6 – 1,3
Negativ	< 9	Grauzone	1,3 – 1,5
Postiv	> 11	Pathologisch	≥ 1,5

*zu den Details sehen Sie bitte die Seiten 9-10



EIASON® Borrelia IgM

IVD

Enzyme immunoassay for the qualitative determination of IgM-class antibodies against *Borrelia burgdorferi* in human serum, plasma or CSF (cerebrospinal fluid)

Instruction for use

For in-vitro use only

Product of



IASON GmbH

Feldkirchner Straße 4

A – 8054 Graz-Seiersberg

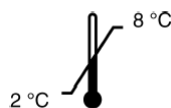
Tel.: +43 (0)316 28 43 00

Fax: +43 (0)316 28 43 00-113







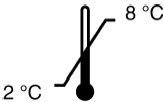









Email: order@iason.eu

www.iason.eu

REF E11-007-96



Used IFU symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro diagnostic device		Microplate
	Order number		Cut Off control
	Manufactured by		Negative control
	Storage at		Positive control
	EC Declaration of conformity		Wash solution
	Expiry date		Substrate
	Lot number		Stop solution
	Conjugate		Sample diluent

Intended Use

For in-vitro use only.

The EIASON® Borrelia IgM kit is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against *Borrelia burgdorferi* in human serum or plasma (citrate, heparin) and in cerebrospinal fluid (CSF) offering increased diagnostic specificity and sensitivity by employing immunodominant antigens. In combination with the recombinant IgG ELISA each clinical phase of Lyme disease - from Erythma chronicum migrans (ECM) over Bannwarth-Syndrom up to Lyme arthritis - may be detected even in borderland cases providing unerring results and diagnostic aid for the clinical staff.

In case of clinically suspected neuroborreliosis, the detection of intrathecally produced Borrelia-specific IgG and IgM antibodies is indicated. For this purpose serum-CSF pairs are analysed in parallel in the quantifiable EIASON® Borrelia burgdorferi IgG/ IgM ELISA. The result can then be confirmed by Blot.

First, serum and CSF are included in the standard Borrelia screening. If the CSF is positive, the values for total IgG and/or IgM and albumin must be requested for serum and CSF as the basis for the detection of the Borrelia specific antibody index.

By this method based on the Borrelia-specific antibody index, an intrathecally produced antibody fraction can be differentiated from a fraction that has passed the blood-CSF barrier passively to enter the subarachnoid space. Applying the limiting value QLim from the quotient diagram according to Reiber ensures that no false-negative antibody index values will be calculated in case of a polyspecific intrathecally immune reaction.

In cases of serum-CSF pairs showing a pathologically elevated antibody index in the screening test, confirmation with Blot is recommended.

Summary

Spirochetes are motile bacteria with a periplasmic axial filament. All pathogenic species belong to the family Treponemataceae, which includes the three genera: Treponema, Borrelia, and Leptospira. The Treponemae are extremely long, flexible, filamentous cells that are usually held in a characteristic spiral, or coiled-spring shape. Borreliae are the largest Treponemataceae with very coarse and irregular spirals. Borrelia burgdorferi, the causative agent of Lyme disease, is transmitted mainly by ticks but probably also by other blood-sucking insects. Habitats are the wooded, humid and temperate regions of North America, Europe, North Africa, Australia and Japan; foresters, farmers, and anybody entering infested forests may be affected.

The degree of contamination of ticks amounts to 3-60% dependent on seasonal and regional differences; up to 30% of the population may be infected (about 1500 cases annually in USA, several hundred in Europe).

Species	Diseases	Symptoms	Mechanism of infection
Borrelia burgdorferi	Lyme diseases	<p>Multisystemic illness</p> <p>Early manifestations: Erythema migrans; flu-like symptoms like fever, myalgias and headaches; carditis; meningitis</p> <p>Late manifestations: Chronic neurological, dermatological and / or cardiological symptoms; Acrodermatitis chronica atrophicans; Herxheimer reaction; Lyme-Arthritis</p>	Transmission by tick bites infected with Borrelia burgdorferi (Ixodes dammini in USA; Ixodes ricinus in Europe)

The presence of pathogen or infection may be identified by

- Microscopy
- PCR
- Serology: e.g. ELISA

Assay principle

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product.

The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

Warnings and precautions

The EIASON® Borrelia IgM kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Damaged test kits

In case of serious damage to the test kit or components, the company IASON must be notified in writing at least one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for the test run. They must be stored until a final solution has been found. After that they should be disposed in accordance with official regulations.

Shelf life and storage of reagents

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2 – 8 °C.

Specimen collection and preparation

Use human serum, plasma (citrate, heparin) and CSF (cerebrospinal fluid) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2-8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70 – -20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing.

Heat inactivation of samples is not recommended.

Serum and CSF must be withdrawn from the patient at the same day. Parallel testing of serum and CSF in the same run is recommended. To increase diagnostic safety, patient sera and CSF should be tested in duplicate.

Sample dilution

Serum 1:101 Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with **DIL**. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgM **DIL** into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

CSF 1:2 50 µL of the green **DIL** are pipetted directly into the well. Then 50 µL CSF are added. Mix well! Please be aware of the correct order.

Materials

1. **MPL** Borrelia burgdorferi Coated Wells (IgM): 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Borrelia burgdorferi antigen; in resealable aluminium foil. The break-apart snap-off strips are coated with recombinant Borrelia burgdorferi antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2-8 °C.
2. **DIL** IgM Sample Diluent: 1 bottle containing 100 mL of ready to use buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured green; white cap.
3. **STOP** Stop Solution: 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L. Ready to use; red cap.
4. **WASH** Washing Buffer (20x conc.): 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 mL **WASH** + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature.
In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.
5. **CONJ** Borrelia burgdorferi anti-IgM Conjugate: 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgM; coloured red, Ready to use; black cap.
6. **SUB** TMB Substrate Solution: 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1%; ready to use; yellow cap; < 5% NMP.
The reagent is ready to use and has to be stored at 2-8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. **PC** Borrelia burgdorferi IgM Positive Control: 1 vial containing 2 mL control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; red cap.
8. **CUTOFF** Borrelia burgdorferi IgM Cut-off Control: 1 vial containing 3 mL control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; green cap.
9. **NC** Borrelia burgdorferi IgM Negative Control: 1 vial containing 2 mL control (human serum or plasma); coloured yellow; ready to use; blue cap.

Materials and equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620nm
- Incubator 37°C
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Timer

Assay procedure

General remarks

1. All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
2. Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
3. Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination
4. Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
5. As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

Test preparation

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described.

If performing the test on ELISA automatic systems we recommend to increase the washing steps from three to five and the volume of washing solution from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects.

Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and controls should be carefully established on the result sheet supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100 µL [NC] [PC] [CUTOFF] and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37±1°C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µL of [WASH]. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.
5. Dispense 100 µL [CONJ] into all wells except for the blank well (e.g. A1). Cover with foil
6. **Incubate for 30 min at room temperature. Do not expose to direct sunlight.**
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 µL [SUB] into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100 µL STOP into all wells in the same order and at the same rate as for the SUB, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620nm within 30 min after addition of the [STOP].

or automated on:

- **IASON® PersonalLab**
- **IASON® Quardette**
- **IASON® Gladiator**

Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader to zero using the substrate blank.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank, subtract its absorbance value substrate blank from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at 450 nm and record the absorbance values for each control and patient sample in the plate layout.

Dual wavelength reading using 620 nm as reference wavelength is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

Results

Assay validation criteria

In order for an assay to be considered valid, the following criteria must be met:

- Substrate blank: Absorbance value < 0.100
- [NC]: Absorbance value < 0.200 and < [CUTOFF]
- [CUTOFF]: Absorbance value 0.150 – 1.300
- [PC]: Absorbance value > [CUTOFF]

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

Calculation of results

1. The **CUTOFF** is the mean absorbance value of the **CUTOFF** determinations.

Example: Absorbance value **CUTOFF** 0.44 + absorbance value **CUTOFF** 0.42 = 0.86
/ 2 = 0.43

$$\text{CUTOFF} = 0.43$$

Results in IASON arbitrary units (IAU)

$\frac{\text{Patient (mean) absorbance value} \times 10}{\text{CUTOFF}} = [\text{IASON arbitrary units} = \text{IAU}]$

Example: $\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ IAU}$

Interpretation of results

Cut-off	10 IAU	
Positive	> 11 IAU	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 IAU	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 IAU	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

Antibody isotypes and state of infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

Evaluation of CSF results

Calculation of threshold values for sera and CSF for the qualitative evaluation:

IgM serum: threshold value = OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ = 10 IAU

IgM CSF: threshold value = 0.5 x OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ = 5 IAU

Interpretation or results

IgM Results	Interpretation and further actions
OD _{Serum} 1:101 < threshold value serum or OD _{Serum} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ < 10 IAU and OD _{CSF} 1:2 < threshold value CSF or OD _{CSF} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ < 5 IAU	No specific IgM antibodies in serum detected. No specific IgM antibodies in CSF detected. No indication of neuroborreliosis No determination of antibody index (AI) IgM
OD _{Serum} 1:101 ≥ threshold value serum or OD _{Serum} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ ≥ 10 IAU and OD _{CSF} 1:2 < threshold value CSF or OD _{CSF} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ < 5 IAU	Detection of specific IgM antibodies in serum No specific IgM antibodies in CSF detected. Indication of a fresh Borrelia infection No indication of neuroborreliosis No determination of antibody index (AI) IgM
OD _{Serum} 1:101 < threshold value serum or OD _{Serum} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ < 10 IAU and OD _{CSF} 1:2 ≥ threshold value CSF or OD _{CSF} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ ≥ 5 IAU	No specific IgM antibodies in serum detected. Detection of specific IgM antibodies in CSF Neuroborreliosis is possible Determination of antibody index (AI) IgM
OD _{Serum} 1:101 ≥ threshold value serum or OD _{Serum} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ ≥ 10 IAU and OD _{CSF} 1:2 ≥ threshold value CSF or OD _{CSF} / OD $\boxed{\text{CUTOFF}}$ ≥ 5 IAU	Detection of specific IgM antibodies in serum Detection of specific IgM antibodies in CSF Neuroborreliosis is possible Determination of antibody index (AI) IgM

The test can be terminated if serum and CSF give negative IgG and IgM results in screening. The Borrelia specific antibody index cannot be determined.

In case the CSF OD exceeds the threshold value, the procedure continues. In the following, IgG and IgM tests will be described in parallel. However, the antibody index is to be determined only for the immunoglobulin class in which a positive screening result for the CSF has been obtained.

Calculation of the specific IgG in IAU/mL

For the conversion of the ODs of CSF and serum into units, extinction values ≤ 2.500 are required.

If the OD value for the serum or CSF is larger than 2.500 or even outside the measurable range, the serum-CSF pair must be retested together in another run after appropriately higher dilution. The following dilutions are recommended:

OD	Serum dilution	CSF dilution (Preparation in the well)
Standard dilution	1:101	1:2 50 μ l DIL + 50 μ L CSF

Result of standard dilution (OD):	Recommendation for further dilutions:	CSF dilution (Preparation in the well)
OD ≤ 2.500	No further dilution	
2.500 < OD ≤ 3.000	1:500	1:5 80 μ L DIL + 20 μ L CSF
OD > 3.000	1:1000; 1:2000; 1:4000	Dilution in a polypropylen (PP) tube 1:10; 1:20; 1:40

The anti-Borrelia specific IgM has to be calculated from OD values of serum and CSF ≤ 2.500 .

If several values are in this range, the value with the OD closest to 1.000 is selected.

Note: As the cut-off in this formula the value of the **CUTOFF** (cut-off for serum) of the corresponding IgM determination is to be used for serum and for CSF. The threshold value for CSF from the qualitative evaluation is not valid here.

$$(1.1) \text{ spec. IgM serum [IAU/ml]} = \text{OD}_{\text{Serum}} \times 10 \times \text{dilution factor} / \text{cut-off} \times 101$$

$$(1.2) \text{ spec. IgM CSF [IAU/ml]} = \text{OD}_{\text{CSF}} \times 10 \times \text{dilution factor} / \text{cut-off} \times 101$$

Calculation of the specific IgM - quotient (Qspec IgM)

$$(2) \quad Q_{\text{spec}} (\text{IgM}) = \text{spec. IgM CSF [IAU/mL]} / \text{spec. IgM serum [IAU/mL]}$$

Calculation of the quotients QIgM, QAlb

Total IgM and albumin in both serum and CSF are determined by using a suitable method.

From the values obtained, the IgM quotient QIgM and the albumin quotient QAlb are calculated according to the following formulas:

$$(3) \quad \text{IgM-quotient } \mathbf{QIgM} = \text{IgM conc. CSF} / \text{IgM conc. serum}$$

$$(4) \quad \text{albumin quotient } \mathbf{QAlb} = \text{albumin conc. CSF} / \text{albumin conc. serum}$$

Calculation of the limiting QLim (IgM)

$$(5) \quad \mathbf{QLim} (\text{IgM}) = 0.67 \times \sqrt{\text{QAlb}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7.1 \times 10^{-3}$$

Calculation of the antibody index (AI)

The values obtained for QIgM and QLim (IgM) are compared and AI (IgM) is calculated using formula as follows:

(6) if $Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)$: **AI (IgM)** = $Q_{spec} (IgM) / Q_{IgM}$

(7) If $Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)$: **AI (IgM)** = $Q_{spec} (IgM) / Q_{Lim} (IgM)$

Interpretation of AI values

$0.6 < AI \leq 1.3$ (IgM) normal

$1.3 < AI < 1.5$ (IgM) borderline

$AI (IgM) \geq 1.5$ pathological

Antibody index values < 0.6 indicate an analytical fault (e.g. clinical chemistry). It is recommended to check whether serum and CSF are taken from the same day and if sample-mix-up can be excluded. A repetitive determination of the values of clinical chemistry and/ or of the Borrelia specific antibodies might be advisable.

Antibody index values $0.6 < AI < 1.3$ are in the normal range. An intrathecal synthesis of antibodies against Borrelia is unlikely. The detected Borrelia-antibodies in the CSF originate from the serum and have passively passed into the CSF space through the blood-liquor barrier.

Antibody index values between 1.3 and 1.5 are borderline cases. The serum-liquor pair should be retested. Or if clinical doubt exists, it is recommended to test another serum-CSF pair in the course of the infection.

Antibody index values ≥ 1.5 are to be classified as pathological. They indicate intrathecal synthesis of Borrelia-antibodies as found in patients suffering from neuroborreliosis.

Quality control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or IASON GmbH directly.

Test characteristics

Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is > 90 % for CSF samples and 98.35% (95% confidence interval: 95.84% - 99.55%) for serum samples.

Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte. It is > 90 % for CSF samples and 92.45% (95% confidence interval: 81.79% - 97.91%) for serum samples.

Precision

Intra-Assay(n=24)			Inter-Assay (n=12)		
Sample	Mean (OD)	CV %	Sample	Mean (IAU)	CV %
1	0.451	4.58	1	26.33	11.26
2	1.172	7.76	2	39.3	8.31
3	1.840	10.22	3	6.38	12.82

Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric sera are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

Note: The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

Limitation of the procedure

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values.

By the use of recombinant antigens, cross reactions with antibodies against the following pathogens can be excluded, as best as possible:

- Treponema pallidum
- Leptospira
- Borrelia recurrentis

A lues-infection should be excluded, because antibodies against p41i could appear.

Legal aspects

Reliability of results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact IASON.

Therapeutic consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under Reliability of Results. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point Therapeutic Consequences are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

Useful publications

1. Asbrink, Eva; Hovmark, Anders (1988): Early and late cutaneous manifestations in Ixodes-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). In *Annals of the New York Academy of Sciences* 539, pp. 4–15.
2. Barbour, Alan G. (2006): *Relapsing Fever and Other Borrelia Diseases*. In Richard L. Guerrant, David H. Walker, Peter F. Weller (Eds.): *Tropical infectious diseases. Principles, pathogens & practice*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 499–510.
3. Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V. (2011): *Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose. Leitlinien der Deutschen Borreliose-Gesellschaft*.
4. Johnson, Russell C.; Schmid, George P.; Hyde, Fred W.; Steigerwalt, A. G.; Brenner, Don J. (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov. Etiologic Agent of Lyme Disease. In *International journal of systematic bacteriology* 34 (4), pp. 496–497. DOI: 10.1099/00207713-34-4-496.
5. Karlsson, Mats; Hovind-Hougen, Kari; Svenungsson, Bo; Stiernstedt, Göran (1990): Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. In *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3), pp. 473–479.
6. Luther, Birgit; Moskophidis, Matthäus (1990): Antigenic cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum*, and *Treponema phagedenis*. In *Zentralblatt für Bakteriologie : international journal of medical microbiology* 274 (2), pp. 214–226.
7. Magnarelli, Louis A.; Fikrig, Erol; Padula, Steven J.; Anderson, John F.; Flavell, Richard A. (1996): Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. In *Journal of Clinical Microbiology* 34 (2), pp. 237–240.
8. Preac-Mursic, V.; Wilske, Bettina; Schierz, G. (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. In *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* 263 (1-2), pp. 112–118.
9. Wilske, Bettina; Preac-Mursic, V.; Fuchs, R.; Schierz, G. (1990): Diagnostik der Lyme Borreliose. Diagnose und Labor. In *Laboratoriumsblätter* 40, pp. 24–36.

Pipetting scheme

Allow all reagents to reach room temperature before use.

1. Predilution	1 part serum or plasma sample + 100 parts DIL	50µL DIL + 50 µL CSF
2. Pipetting	Leave well A1 for blank NC PC CUTOFF diluted sample 100µL	
3. Incubation	1 hour at 37°C	
4. Washing	wash 3 times: aspirate or decant add 300 µL * WASH repeat wash step 2 x and dry on absorbant material	
5. Pipetting	CONJ except blank	100µL
6. Incubation	30 min at room temperature (20-25°C)	
7. Washing	See point 4.	
8. Pipetting	SUB	100µL
9. Incubation	15 min. at room temperature (20-25°C) in the dark	
10. Pipetting	STOP	100µL
11. Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor 3 (depends on photometer), reading within 30 min. Calculation: Patient (mean) absorbance value x 10 / CUTOFF = [Units = IAU]	

*Please increase the volume of diluted WASH to 350 µL, if necessary

Expected values

Serum and plasma samples		Antibody Index IgM*	
	IAU		
Cut Off	10	Normal	0.6 – 1.3
Grey zone	9 - 11	Grey zone	1.3 – 1.5
Negative	< 9	Pathological	≥ 1.5
Postive	> 11		

*please refer to page 24 for details