

## NovaLisa™

# Borrelia burgdorferi

## IgM – ELISA (recombinant)

CE

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

Enzymimmunoassay zur qualitativen immunenzymatischen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in Humanserum oder Plasma und Liquor

Test immunoenzimatico per la determinazione qualitativa degli anticorpi della classe IgM per *Borrelia burgdorferi* nel siero o plasma umano e CSF (liquido cerebrospinale)

Enzimoinmunoensayo para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM contra –*Borrelia burgdorferi* en suero o plasma humano y LCR (líquido ceforraquídeo)

### Only for in-vitro diagnostic use

|           |           |          |
|-----------|-----------|----------|
| English:  | Page      | 2 to 6   |
| Deutsch:  | Seite     | 7 bis 12 |
| Italiano: | da Pagina | 13 a 17  |
| Espanol:  | Página    | 18 a 23  |

For further languages please contact our authorized distributors.

|  |                                   |    |
|--|-----------------------------------|----|
| Bibliography / Literatur /<br>Bibliografía / Bibliografía  | Page / Seite /<br>Pagina / Página | 26 |
| Symbols Key / Symbolschlüssel /<br>Legenda / Símbolos  | Page / Seite /<br>Pagina / Página | 27 |
| Summary of Test Procedure/ Kurzanleitung<br>Testdurchführung/<br>Schema della procedura/ Resumen de la técnica | Page / Seite /<br>Pagina / Página | 28 |

---

Product Number: BORM0040 (96 Determinations)

---

## 1. INTRODUCTION

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 | Erythema chronicum migrans (ECM),<br>Bannwarth<br>Syndrome;dermatologic,rheumatic,cardiologic<br>and neurologic: multisystem disorder | Transmission by tick bites<br>infected with Borrelia<br>Borrelia burgdorferi<br>(Ixodes<br>dammini,USA:Ixodes<br>ricinus,Eurpoe) |

Because of its multisystemic character, unequivocal diagnosis of Lyme disease is difficult. Only early detection permits efficient control by antibiotics, since in the chronic phase borreliae are nearly inaccessible. The presence of bacteria resp. infection may be identified by:

- Microscopy: Giemsa or Wright-stained blood smears
- PCR
- Serology: Detection of antibodies by IF, ELISA, immunoblotting

## 2. INTENDED USE

The **recombinant** NovaTec Borrelia burgdorferi IgM-ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against Borrelia burgdorferi in human serum or plasma (citrate) and CSF (cerebrospinal fluid) 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 over Bannwarth-Syndrom up to Lyme arthritis - may be detected even in borderland cases providing unerring results and diagnostic aid for the clinical staff.

For the determination of intrathecally produced IgG antibodies a separate instruction for use for CSF can be obtained at NovaTec.

## 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The major constituent of B. burgdorferi flagella is flagellin (41 kDa, p41). Whereas the lipoprotein OspC (22 kDa, p22) within the outer membrane of the spirochete induces an early antibody formation in the ECM-phase of Lyme disease. Recombinant p41i is included in the presented antigens to avoid crossreactivity with antibodies of syphilitic sera.

The NovaTec Borrelia burgdorferi IgM-ELISA contains the recombinant epitope OspC of the phylum PKo (B. afzelii) and 20047 (B. garinii) and p41i of the phylum PBi (B. garinii).

Microtiter strip wells are pre-coated with **recombinant** Borrelia burgdorferi antigens. Diluted patient specimens and ready to use controls are added to these wells and antibodies recognizing the immobilized B. burgdorferi antigen bind during the first incubation. After washing the wells to remove all unbound sample and control material horseradish peroxidase labelled anti-human IgM conjugate is added. During a second incubation this conjugate binds to the captured antibodies, and the excess unbound conjugate is removed by a further wash step. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized with TMB Substrate Solution which gives a blue reaction product, the intensity of which is proportional to the amount of B. burgdorferi-specific IgM antibody in the patient specimen. Sulphuric acid is added to each well to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

## 4. MATERIALS

### 4.1. Reagents supplied

- **Borrelia burgdorferi Coated Wells (IgM):** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with Borrelia burgdorferi antigen; in resealable aluminium foil.
- **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.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml. Ready to use sulphuric acid, 0.2 mol/l; red cap.
- **Washing Solution (20x conc.):** 1 bottle each containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer (pH 7.2 ± 0.2) for washing the wells; white cap.

- **Borrelia burgdorferi anti-IgM Conjugate\*\*:** 1 bottle containing 20 ml of peroxidase labelled rabbit antibody to human IgM.; coloured red, Ready to use; black cap.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; yellow cap.
- **Borrelia burgdorferi IgM Positive Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; red cap.
- **Borrelia burgdorferi IgM Cut-off Control\*\*\*:** 1 bottle containing 3 ml; coloured yellow; ready to use; green cap.
- **Borrelia burgdorferi IgM Negative Control\*\*\*:** 1 bottle containing 2 ml; coloured yellow; ready to use; blue cap.

\* contains 0.1 % Bronidox L after dilution

\*\* contains 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contains 0.1 % Kathon

## 4.2. Materials supplied

- 1 Strip holder
- 1 Cover foil
- 1 Test protocol
- 1 distribution and identification plan

## 4.3. 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

## 5. STABILITY AND STORAGE

---

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

## 6. REAGENT PREPARATION

---

*It is very important to bring all reagents, samples and controls to room temperature (20...25°C) before starting the test run!*

### 6.1. Coated snap-off strips

The ready to use breakapart snap-off strips are coated with *Borrelia burgdorferi* antigen. Store at 2...8°C. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

### 6.2. Borrelia burgdorferi anti-IgM Conjugate

The bottle contains 20 ml of a solution with anti-human-IgM horseradish peroxidase, buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. The solution is ready to use. Store at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.3. Controls

The bottles labelled with Positive, Cut-off and Negative Control contain a ready to use control solution. It contains 0.1% Kathon and has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.4. IgM Sample Diluent

The bottle contains 100 ml phosphate buffer, anti human-IgG, stabilizers, preservatives and an inert green dye. It is used for the dilution of the patient specimen. The solution contains anti human IgG class antibodies to eliminate competitive inhibition from specific IgG class antibody to remove rheumatoid factor. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C. *After first opening stability expiry date when stored at 2...8°C.*

### 6.5. Washing solution (20xconc.)

The bottle contains 50 ml of a concentrated buffer, detergents and preservatives. Dilute Washing Solution 1+19; e.g. 10 ml Washing Solution + 190 ml fresh and germ free redistilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature. *After first opening stability until expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.6. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. 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. After first opening the concentrate is stable until the expiry date when stored at 2...8°C.*

## 6.7. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.2 M sulphuric acid solution (R 36/38, S 26). This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

*After first opening stability until expiry date.*

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

---

Use human serum or plasma (citrate) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the specimen should be kept at 2...8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20 to -70°C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. *Avoid repeated freezing and thawing.* Heat inactivation of samples is not recommended.

### 7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Diluent. Dispense 10µl sample and 1 ml IgM Sample Diluent into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

## 8. ASSAY PROCEDURE

---

### 8.1. 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 300µl to 350µl 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.

Please allocate at least:

|         |              |                             |
|---------|--------------|-----------------------------|
| 1 well  | (e.g. A1)    | for the substrate blank,    |
| 1 well  | (e.g. B1)    | for the negative control,   |
| 2 wells | (e.g. C1+D1) | for the cut-off control and |
| 1 well  | (e.g. E1)    | for the positive control.   |

*It is left to the user to determine controls and patient samples in duplicate, if necessary.*

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each control and sample.

Adjust the incubator to 37° ± 1°C.

1. Dispense 100µl controls 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 300µl of washing solution. Avoid overflows from the reaction wells. The soak time between each wash cycle should be >5 sec. 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 100µl Borrelia burgdorferi anti-IgM Conjugate 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 100µl TMB Substrate Solution into all wells
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark.**
10. Dispense 100µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution.  
*Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.*

*Note: Highly positive patient samples can cause dark precipitates of the chromogen! These precipitates have an influence when reading the optical density. Predilution of the sample with physiological sodium chloride solution, for example 1+1, is recommended. Then dilute the sample 1+100 with dilution buffer and multiply the results in NTU by 2.*

11. Measure the absorbance of the specimen at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

## 8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

*If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 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 distribution and identification plan.

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

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

## 9. RESULTS

---

### 9.1. Assay Validation Criteria

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

- **Substrate blank** in A1: Absorbance value < **0.100**.
- **Negative control** in B1: Absorbance value < **0.200 and < cut-off**
- **Cut-off control** in C1 and D1: Absorbance value **0.150 – 1.30**.
- **Positive control** in E1: Absorbance value > **cut-off**.

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

### 9.2. Calculation of Results

The cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off control determinations.

*Example: Absorbance value Cut-off control 0.39 + absorbance value Cut-off control 0.37 = 0.76 / 2 = 0.38*

*Cut-off = 0.38*

### 9.3. Interpretation of Results

Samples are considered **POSITIVE** if the absorbance value is higher than 10% over the cut-off.

Samples with an absorbance value of 10% above or below the cut-off should not be considered as clearly positive or negative

→ **grey zone**

It is recommended to repeat the test again 2 - 4 weeks later with a fresh sample. If results in the second test are again in the grey zone the sample has to be considered **NEGATIVE**.

Samples are considered **NEGATIVE** if the absorbance value is lower than 10% below the cut-off.

#### 9.3.1. Results in NovaTec Units

Patient (mean) absorbance value x 10 = [NovaTec-Units = NTU]  
cut-off

*Example:  $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32$  NTU (NovaTec Units)*

|            |     |      |     |
|------------|-----|------|-----|
| Cut-off :  | 10  | NTU  |     |
| Grey zone: |     | 9-11 | NTU |
| Negative:  | <9  | NTU  |     |
| Positive:  | >11 | NTU  |     |

## 10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

---

### 10.1. Precision

| <b>Intraassay</b> | <b>n</b> | <b>Mean value</b> | <b>CV (%)</b> |
|-------------------|----------|-------------------|---------------|
| Pos. Serum        | 8        | 1.06              | 8.6           |
| <b>Interassay</b> | <b>n</b> | <b>Mean value</b> | <b>CV (%)</b> |
| Pos. Serum        | 14       | 0.76              | 4.1           |

### 10.2. 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 98.8%

### 10.3. 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 93%.

## 10.4. 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 0.2 mg/ml bilirubin.

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

## 11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

---

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimen may affect the absorbance values. 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 immunosuppressed patients and newborns serological data only have restricted value. A neg. result (IgM or IgG) cannot exclude an infection with *B. burgdorferi*. Especially in the early phase of infection there is the possibility that none or no detection quantities of the antibodies do exist. In the case of infection or a grey zone result we recommend a further sample after 2-3 weeks. A positive result of IgM does not always mean that an acute infection exists because the antibodies of a previous infection can persist. The use of recombinant antigens avoid extensively cross reactions with the following antibodies: *Treponema pallidum*, *Leptospira*, *Borrelia recurrentis*. Antibodies of a lues-infection to p41i were occasionally determined. Therefore a lues-infection should be excluded.

## 12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

---

- In compliance with article 1 paragraph 2b European directive 98/79/EC the use of the in vitro diagnostic medical devices is intended by the manufacturer to secure suitability, performances and safety of the product. Therefore the test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaLisa™ ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

WARNING: In the used concentration Bronidox L has hardly any toxicological risk upon contact with skin and mucous membranes!

WARNING: Sulphuric acid irritates eyes and skin. Keep out of the reach of children. Upon contact with the eyes, rinse thoroughly with water and consult a doctor!

### 12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

## 13. ORDERING INFORMATION

---

Prod. No.: BORM0040 *Borrelia burgdorferi* IgM-ELISA (96 Determinations)

## 1. EINLEITUNG

Spirochäten sind spiralförmig 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 Spiralförmigkeit. Borrelien sind zarte (0,2-0,5µm), 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      | Inkubationszeit  | Symptome   | Infektionsmodus   |
|----------------------|-----------------|------------------|--|---|
| Borrelia burgdorferi | Lyme-Borreliose | 5 -29 Tage (ECM) | Erkrankung verläuft in drei Stadien:<br>1. Erythema chronicum migrans<br>2. Morbus Bannwarth (dermat., kardiale, rheumatische Manifestationen möglich)<br>3. Lyme-Arthritis, Enzephalomyelitis | Übertragung durch Zeckenbiss.<br><br>In Europa durch Ixodes ricinus,<br><br>In den USA durch Ixodes damini. |

### Nachweis:

- Mikroskopie : nach Giemsa oder Wright gefärbte Blutaussstriche
- PCR
- Serologie: Antikörpernachweis mittels IF, ELISA Immunoblotting

Zuverlässig wird die Diagnose durch den Nachweis von IgG-Antikörpern im Serum in Verbindung mit dem klinischen Befund gestellt. Während der verschiedenen Stadien dominieren jeweils Antikörper gegen unterschiedliche bakterielle Antigene, z.B. auf den Geißeln oder der äußeren Membran.

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec Borrelia burgdorferi IgM ELISA ist für den qualitativen Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen Borrelia burgdorferi in humanem Serum oder Plasma (Citrat) und Liquor bestimmt. Für die Bestimmung intrathekal produzierter IgG Antikörper kann bei NovaTec eine separate Arbeitsanleitung angefordert werden.

## 3. TESTPRINZIP

Die qualitative immunenzymatische Bestimmung von gegen B. burgdorferi gerichtetem spezifischem IgM beruht auf der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Technik. Hauptbestandteil der B. burgdorferi Flagelle ist **Flagellin** (41 kDA, p41). Dieses Protein zusammen mit dem spezies-spezifischen Lipoprotein **OspC** der Außenmembran der Spirochäte induziert die Bildung einer frühen Antikörperformation in der ECM-Phase der Erkrankung (Frühphase, Stadium I).

Kreuzreaktionen mit syphilitischen Seren werden durch die Verwendung von **p41i** als Antigen vermieden.

Der vorliegende Kit enthält die rekombinant hergestellten Epitope OspC der Stämme PKo (B. afzelii) und 20047 (B. garinii) sowie p41i des Stammes PBi (B. garinii).

Mikrotiterstreifen als solide Phase sind beschichtet mit den oben aufgeführten Antigenen. Vorhandene spezifische Antikörper in der Probe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Peroxidase-konjugierte anti-human IgM-Antikörper binden an Antigen-Antikörperkomplexe in positiven Proben. Die entstanden Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit TMB-Substratlösung nachgewiesen. Stoppen der enzymatischen Reaktion mit Schwefelsäure führt zu einem Farbumschlag von blau zu gelb, der einfach nachgewiesen und mit einem ELISA-Reader bei 450 nm gemessen werden kann.

## 4. MATERIALIEN

---

### 4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **B. burgdorferi beschichtete Mikrotiterstreifen (IgM):** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit rekombinanten B. burgdorferi-Antigenen; in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer\*\*\*:** 1 Flasche mit 100 ml Puffer zur Probenverdünnung; enthält anti-human-IgG-Antikörper; pH 7.2 ± 0.2; grün gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Stopplösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure, 0.2 mol/l; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):\*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Kavitäten; pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **B. burgdorferi anti-IgM-Konjugat\*\*:** 1 Flasche mit 20 ml Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen humanes IgM; rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB-Substratlösung:** 1 Fläschchen mit 15 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **B. burgdorferi IgM Positivkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; rote Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **B. burgdorferi IgM Cut-off Kontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 3 ml; gelb gefärbt; grüne Verschlusskappe; gebrauchsfertig.
- **B. burgdorferi IgM Negativkontrolle\*\*\*:** 1 Fläschchen mit 2 ml; gelb gefärbt; blaue Verschlusskappe; gebrauchsfertig.

\* enthält 0.1 % Bronidox L nach Verdünnung

\*\* enthält 0.2 % Bronidox L

\*\*\* enthält 0.1 % Kathon

### 4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Rahmenhalter
- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt

### 4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Feuchtkammer/Brutschrank mit Thermostat
- Manuelle oder automatische Waschorruchtung
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mischer
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Röhrchen-Ständer
- Aqua dest.
- Timer

## 5. STABILITÄT UND LAGERUNG

---

Testkit bei 2...8°C lagern. Die Reagenzien nicht nach den angegebenen Verfallsdaten verwenden. Die Verfallsdaten sind jeweils auf den Flaschenetiketten und auf dem Außenetikett angegeben.

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

---

*Alle Reagenzien, Proben und Kontrollen sind vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur(20...25°C) zu bringen!*

### 6.1. Beschichtete Streifen

Die abbrechbaren Streifen sind mit inaktivierten, rekombinanten B. burgdorferi Antigenen beschichtet. Die gebrauchsfertigen Vertiefungen sind bei 2...8°C aufzubewahren. *Nichtverbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8°C lagern. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum.*

### 6.2. B. burgdorferi anti-IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 20 ml einer Lösung von anti-human IgM-Meerrettichperoxidase, Puffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.3. Kontrollen

Die Fläschchen mit Kontrollen enthalten 2 bzw. 3 ml gebrauchsfertige Kontrolllösung. Die gebrauchsfertigen Lösungen sind bei 2...8°C aufzubewahren und enthalten 0.1 % Kathon. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.4. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 100 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten grünen Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung enthält anti-human-IgG-Antikörper, um den Proben spezifische IgG-Anteile sowie IgG-gebundene Rheumafaktoren zu entziehen. Sie wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt und ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.5. Waschlösung (20x konz.)

Die Flasche enthält 50 ml konzentrierten Puffer, Detergenzien und Konservierungsmittel. Der Inhalt wird auf einen Liter mit Aqua dest. verdünnt (1+19). Der verdünnte Puffer ist bei Raumtemperatur 5 Tage haltbar. Die Waschlösung wird zum Waschen der Streifen eingesetzt. *Sollte eine Kristallisation im Konzentrat auftreten, die Waschlösung auf 37°C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen. Nach dem ersten Öffnen, Konzentrat haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

### 6.6. TMB-Substratlösung

Das Fläschchen enthält 15 ml eines Tetramethylbenzidin- Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist leicht bläulich. Sollte die TMB-Substratlösung dunkelblau sein, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum Verfallsdatum bei sachgerechter Lagerung von 2...8°C.*

### 6.7. Stopplösung

Das Fläschchen enthält 15 ml 0,2 M Schwefelsäure (R36/38, S26). Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8°C aufzubewahren. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei 2...8°C).*

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

---

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

### 7.1. Probenverdünnung

Proben vor Testbeginn im Verhältnis 1+100 mit IgM-Probenverdünnungspuffer verdünnen, z.B. 10µl Probe und 1 ml IgM-Probenverdünnungspuffer in die entsprechenden Röhrchen pipettieren, um eine Verdünnung von 1+100 zu erhalten; gut mischen (Vortex).

## 8. TESTDURCHFÜHRUNG

---

### 8.1. Testvorbereitung

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 Ergebnisblatt die Verteilung bzw. Position der Patientenproben und Standards auf den Mikrotiterstreifen genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Hierbei mindestens

|                |              |                                     |
|----------------|--------------|-------------------------------------|
| 1 Vertiefung   | (z.B. A1)    | für den Substratleerwert (Blank),   |
| 1 Vertiefungen | (z.B. B1)    | für die Negativ Kontrolle und       |
| 2 Vertiefungen | (z.B. C1+D1) | für die Cut-off Kontrolle und       |
| 1 Vertiefung   | (z.B. E1)    | für die Positiv Kontrolle vorsehen. |

*Prinzipien der Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin erfordern zur höheren Sicherheit für Kontrollen und Patientenproben mindestens Doppelbestimmungen.*

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Brutschrank auf 37 ± 1°C einstellen.

1. Je 100 µl Kontrollen 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.**

- Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend dreimal mit 300µl Waschpuffer waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. 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 falsch erhöhten Messergebnissen führt!*

- 100µl B. burgdorferi anti-IgM Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes vorgesehenen, pipettieren. Mit Folie abdecken.
- 30 min bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
- Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
- 100µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren.
- Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25°C) inkubieren.**
- In alle Vertiefungen 100µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung Zugabe pipettieren. Während der Inkubation gebildete blaue Farbe schlägt in gelb um.

***Hinweis:** Hochpositive Patientenproben können schwärzliche Präzipitate des Chromogens verursachen! Diese Präzipitate beeinflussen die Messwerte. Es wird empfohlen, die Patientenprobe mit physiologischer Kochsalzlösung 1 + 1 zu verdünnen und anschließend die verdünnte Probe mit IgM-Probenverdünnungspuffer 1 + 100 für den Test vorzubereiten. Das Ergebnis in NTU wird in diesem Fall mit zwei multipliziert.*

- Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung messen

## 8.2. Messung

Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in A1 den **Nullabgleich** des Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Readers) vornehmen.

*Falls diese Eichung aus technischen Gründen nicht möglich ist, muss nach der Messung der Extinktionswert der Position A1 von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden, um einwandfreie Ergebnisse zu erzielen!*

**Extinktion** aller Kavitäten bei **450 nm** messen und die Messwerte der Kontrollen und Proben in das Ergebnisblatt eintragen.

*Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.*

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

## 9. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

---

### 9.1. Testgültigkeitskriterien

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

- **Substrat-Leerwert** in A1: Extinktion **niedriger als 0,100**
- **Negativ Kontrolle** in B1: Extinktion **< 0,200 und < cut-off**
- **Cut-off Kontrolle** in C1 und D1: Extinktion **0,150 – 1,300**
- **Positiv Kontrolle** in E1: Extinktion **> Cut-off**

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

### 9.2. Messwertberechnung

Der Cut-off ergibt sich aus dem Mittelwert der gemessenen Extinktionen der beiden Cut-off Kontrollen.

*Beispiel: 0.37 OD Cut-off Kontrolle + 0.39 OD Cut-off Kontrolle = 0.76 : 2 = 0.38*

*Cut-off = 0.38*

### 9.3. Interpretation der Ergebnisse

Patientenproben gelten als **positiv**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % höher liegt als der Cut-Off.

Patientenproben mit Extinktionswerten 10 % über bzw. unter dem Cut-Off können nicht eindeutig als positiv bzw. negativ angesehen werden → **Grauzone**

Es wird empfohlen den Test nach 2 bis 4 Wochen mit einer frischen Patientenprobe zu wiederholen. Finden sich die Ergebnisse erneut innerhalb der Grauzone, gilt die Probe als **negativ**.

Patientenproben gelten als **negativ**, wenn der Extinktionswert mindestens 10 % unterhalb des Cut-Offs liegt.

### 9.3.1. Ergebnisse in NovaTec-Einheiten [NTU]

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Patientenprobe} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Beispiel:  $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

|           |     |      |     |
|-----------|-----|------|-----|
| Cut-Off:  | 10  | NTU  |     |
| Grauzone: |     | 9-11 | NTU |
| Negativ:  | <9  | NTU  |     |
| Positiv:  | >11 | NTU  |     |

## 10. TESTMERKMALE

---

### 10.1. Präzision

| <u>Interassay</u> | <u>n</u> | <u>Mittelwert</u> | <u>Vk (%)</u> |
|-------------------|----------|-------------------|---------------|
| Pos. Serum        | 14       | 0.76              | 4.1           |

| <u>Intraassay</u> | <u>n</u> | <u>Mittelwert</u> | <u>Vk (%)</u> |
|-------------------|----------|-------------------|---------------|
| Pos. Serum        | 8        | 1.06              | 8.6           |

### 10.2. Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 98.8 %.

### 10.3. Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität ist definiert als die Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern. Sie beträgt 93 %.

### 10.4. Interferenzen

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben ergaben bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml für Hämoglobin, von 5 mg/ml Triglyceride und von 0,2 mg/ml für Bilirubin keine Interferenzen im vorliegenden ELISA.

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

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

---

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

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 der serologischen Tests nur einen begrenzten Wert.

Ein negatives Ergebnis kann eine Infektion nicht ausschließen. Besonders in der frühen Infektionsphase können Antikörper in Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorliegen. Es wird daher empfohlen, bei begründetem Verdacht auf Borreliose bzw. einem Befund im Graubereich nach 2-3 Wochen eine weitere Probe zu testen.

Bei einem positiven Ergebnis wird empfohlen dieses mit einem weiteren Testsystem (Blot) zu bestätigen.

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

- *Treponema pallidum*
- *Borrelia recurrentis*
- *Leptospira*

Bei Lues-Infektionen wurden vereinzelt Antikörper gegen p41i nachgewiesen. Daher sollte eine Lues-Infektion ausgeschlossen werden.

Bei einer infektiösen Mononukleose (EBV-Infektion) kann es zu einer Kollektion einer Stimulierung von B-Lymphozyten kommen. Dies kann zu unspezifischen Reaktionen beim IgM-Nachweis führen. Es wird daher empfohlen beim Vorliegen einer schwachen IgM Antwort und unklarem klinischen Bild eine EBV IgM Infektion auszuschließen.

## 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

---

- Gemäß Art. 1 Abs. 2b der EU-Richtlinie 98/79/EG legt der Hersteller die Zweckbestimmung von In-vitro-Diagnostika fest, um deren Eignung, Leistung und Sicherheit sicherzustellen. Daher sind die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAG nicht-reaktiv getestet. Dennoch sind alle Materialien als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat- und Standardfläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaLisa™ ELISA ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>WARNUNG:</b> | Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.       |
| <b>WARNUNG:</b> | Schwefelsäure reizt Augen und Haut! Nach Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen. |

### 12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

## 13. BESTELLINFORMATIONEN

---

Produktnummer: BORM0040      Borrelia burgdorferi IgM-ELISA (96 Bestimmungen)

## 1. INTRODUZIONE

Le Spirochete appartengono alla famiglia dei Treponomataceae che comprende le specie *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*. Hanno una lunghezza di 250µm, sono gram negativi con un diametro di 0,1-3µm. La *Borrelia burgdorferi* è l'agente eziologico del morbo di Lyme. Viene trasmessa soprattutto dalle zecche *Ixodes dammini* e *Ixodes pacificus*. Nel 1975 è stata scoperta per la prima volta a Lyme USA. Burgdorfer et al. hanno isolato per la prima volta il batterio nel 1983. Il morbo di Lyme è una malattia molto diffusa nel mondo. Non esiste una vera profilassi. Il 10-20 % circa delle zecche europee sono contaminate. I focolai naturali sono boschi umidi e caldi in Europa, Nord America, Africa, Australia e Giappone. La distribuzione stagionale della malattia individua un picco costantemente presente in tarda primavera-inizio estate (Giugno-Luglio), mentre i sintomi più tardivi si concentrano in autunno-inizio inverno. A causa dei sintomi poco specifici la diagnosi è difficile e viene fatta spesso troppo tardi. La terapia con antibiotici è efficace soltanto dopo una diagnosi precoce, nella fase cronica la cura diventa molto difficile.

| Specie                      | Malattia      | Sintomi  | Modo d'infezione |
|-----------------------------|---------------|--|------------------|
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | Morbo di Lyme | Tre stadi:<br>1. Erythema cronicum migrans<br>2. Morbo di Bannwarth<br>3. Artrite di Lyme, Encefalomielite | Morso di zecche. |

### Diagnosi

- Microscopia: colorazione di Giemsa; colorazione di Wright per cellule ematiche
- PCR
- Sierologia: ELISA; immunofluorescenza indiretta IFA

## 2. USO PREVISTO

Il NovaTec *Borrelia burgdorferi* IgM ELISA è un kit per la determinazione qualitativa degli anticorpi specifici della classe IgM per *Borrelia burgdorferi* nel siero o plasma (citrato) umano e CSF (liquido cerebrospinale). Presso il NovaTec sono disponibili le istruzioni corrispondenti.

## 3. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa degli anticorpi IgM per *Borrelia burgdorferi* si basa sul principio ELISA. La parte preponderante del flagello di *B. burgdorferi* è la **flagellina** (41kDa, p41). Questa proteina insieme con lipoproteine specifiche (OspC) della spirocheta induce la formazione di anticorpi nella prima fase della malattia. Reazioni incrociate con il siero positivo da sifilide vengono evitate mediante l'uso dell'antigene p41.

Il presente kit contiene epitopi **OspC** delle specie PKo (*B. afzelii*) e 20047 (*B. garinii*), e **p41i** della specie PBi (*B. garinii*). I pozzetti delle micropiastre contengono una fase solida con antigeni specifici della *Borrelia burgdorferi*. Anticorpi specifici nel campione si legano agli antigeni immobilizzati nei pozzetti. Gli anticorpi del coniugato (perossidasi di rafano-anticorpi anti-IgM umani) si legano ai complessi antigene (fase solida)-anticorpo (paziente) nei campioni positivi. Questi complessi vengono evidenziati da una colorazione blu dopo l'incubazione con la soluzione TMB. L'intensità di questa colorazione è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici per la *Borrelia burgdorferi* di classe IgM presenti nel campione. Fermando la reazione enzimatica con acido solforico si causa un cambiamento di colore dal blu al giallo che può essere misurato facilmente con un fotometro per l'ELISA a 450 nm.

## 4. MATERIALI

### 4.1. Reagenti forniti

- **Micropiastre con antigeni dell *Borrelia burgdorferi* (IgM):** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, con adesi antigeni ricombinanti della *Borrelia burgdorferi*; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **Tampone diluente IgM\*\*\*:** 1 fialone contenente 100 ml di tampone per diluire i campioni; pH 7.2 ± 0.2; color verde; pronto all'uso; tappo bianco; contiene anticorpi anti IgG umani.
- **Soluzione stop:** 1 fialone contenente 15 ml di acido solforico, 0.2 mol/l, pronto all'uso; tappo rosso.
- **Tampone di lavaggio (20x conc.):\*** 1 fialone contenente 50 ml di un tampone concentrato 20 volte per il lavaggio dei pozzetti; pH 7.2 ± 0.2; tappo bianco.
- **Coniugato *Borrelia burgdorferi* anti IgM\*\*:** 1 fialone contenente 20 ml di anticorpi di coniglio anti-IgM umani, coniugati a perossidasi; color rosso; pronto all'uso; tappo nero.
- **Soluzione TMB:** 1 fialone contenente 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB); pronto all'uso; tappo giallo.
- ***Borrelia burgdorferi* IgM Controllo positivo\*\*\*:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo rosso; pronto all'uso.
- ***Borrelia burgdorferi* IgM Controllo Cut-off\*\*\*:** 1 fialone da 3 ml; color giallo; tappo verde; pronto all'uso.
- ***Borrelia burgdorferi* IgM Controllo negativo\*\*\*:** 1 fialone da 2 ml; color giallo; tappo blu; pronto all'uso.

\* contiene 0.1 % Bronidox L dopo diluizione

\*\* contiene 0.2 % Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1 % Kathon

## 4.2. Accessori forniti

- 1 pellicola adesiva
- 1 supporto per micropiastre
- 1 istruzione per l'uso
- 1 foglio di controllo

## 4.3. Materiali e attrezzature necessari

- Fotometro per micropiastre con filtri da 450/620 nm
- Incubatore a 37°C
- Lavatore di micropiastre
- Micropipette con punte monouso (10, 100, 200, 1000 µl)
- Vortex-Mixer
- Provette monouso
- Supporto per provette
- Acqua deionizzata o distillata.
- Timer

## 5. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

---

I reagenti devono essere conservati tra 2-8°C. Non usare i reagenti dopo la scadenza. La data di scadenza è stampata sull'etichetta di ogni componente e sull'etichetta esterna della confezione.

## 6. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

---

*Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso!*

### 6.1. Micropiastre

I pozzetti sono separabili e sotto vuoto. Contengono adesivi antigenici ricombinanti inattivati della *Borrelia burgdorferi*. I pozzetti, pronti all'uso, devono essere conservati tra 2-8°C. *Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto con il gel essiccante di silice. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.2. Coniugato *Borrelia burgdorferi* IgM

Il flacone contiene 20 ml di anticorpi anti-IgM umani coniugati a perossidasi di rafano, stabilizzanti, conservanti e un colorante inerte rosso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.3. Controlli

I flaconi dei controlli contengono di soluzione pronta all'uso. Contengono 0,1% Kathon. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.4. Tampone diluente IgM

*Il flacone contiene 100 ml di tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante verde inerte. La soluzione contiene anticorpi anti IgG umani per togliere dagli campioni gli anticorpi specifici della classe IgG ed i fattori reumatici legati ad anticorpi IgG. Viene usata per diluire i campioni. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.5. Tampone di lavaggio (20x conc.)

Il flacone contiene 50 ml di un tampone concentrato, detergenti e conservanti. Il contenuto viene diluito con acqua deionizzata o distillata (1 + 19). Il tampone diluito è stabile fino 5 giorni se conservato a temperatura ambiente. *Se sono presenti cristalli, scioglierli a 37°C prima di diluire. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.6. Soluzione TMB

Il flacone contiene 15 ml di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno pronto all'uso. Conservare al buio. *La soluzione è incolore o celeste chiaro. Nel caso in cui diventasse blu significa che è contaminata e non può essere più usata. Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

### 6.7. Soluzione Stop

Il flacone contiene 15 ml di acido solforico, 0,2 mol/l (R36/38, S26), pronto all'uso. *Una volta aperto, il prodotto è stabile fino alla data di scadenza se conservato tra 2-8°C.*

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

---

Usare campioni di siero o plasma (citrate) umano. Se il test viene fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2-8°C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra -70...-20°C. Agitare bene i campioni scongelati prima di diluirli. *Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.* L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

## 7.1. Diluizione dei campioni

Prima del test, diluire i campioni 1 + 100 con tampone diluente IgM. Per esempio, pipettare nelle provette 10 µl di campione + 1 ml di tampone e mescolare bene (Vortex).

## 8. PROCEDIMENTO

---

### 8.1. Preparazione del test

Leggere bene le istruzioni prima di iniziare il dosaggio. Per ottenere risultati validi è indispensabile seguire esattamente le istruzioni. La seguente procedura è stata validata per l'esecuzione manuale. Per una esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di incrementare il numero di lavaggi da 3 a 5 volte e il volume della soluzione di lavaggio da 300 a 350 µl per evitare interferenze. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione ed identificazione dei campioni e controlli sul foglio di lavoro fornito con il kit. Inserire i pozzetti necessari nel supporto micropiastre

Utilizzare almeno:

|            |             |                                 |
|------------|-------------|---------------------------------|
| 1 pozzetto | (es. A1)    | per il bianco-substrato (blank) |
| 1 pozzetti | (es. B1)    | per il controllo negativo       |
| 2 pozzetti | (es. C1+D1) | per il controllo Cut-off        |
| 1 pozzetto | (es. E1)    | per il controllo positivo.      |

*È consigliato effettuare ogni analisi in duplicato.*

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza pause.

Utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e controllo.

Regolare l'incubatore a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

1. Pipettare 100 µl di controllo e di campione diluito nei relativi pozzetti. Usare il pozzetto A1 per il bianco-substrato.
2. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
3. **Incubare 1 ora  $\pm$  5 min a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .**
4. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola ed aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti tre volte con 300 µl di tampone di lavaggio. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere almeno di 5 sec. Dopo il lavaggio picchiare delicatamente i pozzetti con l'apertura verso il basso su una carta assorbente per togliere completamente il liquido.

*Attenzione: Il lavaggio è una fase critica. Un lavaggio non accurato determina una cattiva precisione del test ed un innalzamento falsato delle densità ottiche.*

5. Pipettare 100 µl di Coniugato Borrelia burgdorferi anti-IgM in tutti i pozzetti, escludendo quello con il bianco-substrato (blank). Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva.
6. **Incubare 30 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$ ).** Non esporre a fonti di luce diretta.
7. Ripetere il lavaggio secondo punto 4.
8. Pipettare 100 µl di Soluzione TMB in tutti i pozzetti.
9. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente ( $20^{\circ}\dots 25^{\circ}\text{C}$ ) al buio.**
10. Pipettare 100 µl di Soluzione Stop in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della soluzione TMB. *Durante l'incubazione il colore cambia dal blu al giallo.*

*Attenzione: Campioni con un risultato positivo molto alto possono causare precipitati scuri del cromogeno! Questi precipitati influenzano la lettura delle densità ottiche. È consigliato diluire i campioni con soluzione fisiologica NaCl, esempio 1+1. Poi diluire normalmente 1 + 100 con tampone diluente IgM. Il risultato NTU viene moltiplicato per due.*

11. Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta della soluzione stop.

### 8.2. Misurazione

Regolare il fotometro per le micropiastre (ELISA-Reader) **a zero** usando il substrato-bianco (blank) **in A1**. *Se, per motivi tecnici, non è possibile regolare il fotometro sottrarre l'assorbanza del bianco-substrato da tutti i valori delle altre assorbanze.*

**Misurare l'assorbanza** di tutti i pozzetti a **450 nm** e inserire tutti i valori misurati nel foglio di lavoro.

*È raccomandato fare una misurazione delle densità ottiche a doppia lunghezza d'onda utilizzando i 620 nm come lunghezza di riferimento.*

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

## 9. RISULTATI

---

### 9.1. Validazione del test

Il test è valido se risponde ai prossimi criteri:

- **Substrato bianco** in A1: Valore di assorbanza < **0.100**
- **Controllo negativo** in B1: Valore di assorbanza < **0.200 e< cut-off**
- **Controllo Cut-off** in C1 e D1: Valore di assorbanza **0.150 – 1.30**
- **Controllo positivo** in E1: Valore di assorbanza >**Cut-Off**

Se non vengono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

### 9.2. Calcolo dei risultati

Il Cut-Off è la media dei valori di assorbanza dei controlli Cut-off.

Esempio: Valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.39 + valore di assorbanza del controllo Cut-off 0.37 = 0.76/2 = 0.38  
Cut-Off = 0.38

### 9.3. Interpretazione dei risultati

I campioni sono **positivi**, se l'assorbanza supera il Cut-Off almeno del 10 %.

Campioni con assorbanze del 10 % al di sopra o al di sotto del Cut-Off non sono identificabili come positivi o negativi → **Dubbio**

In questo caso è raccomandato di ripetere il test dopo 2 o 4 settimane con un campione fresco. Se il risultato è ancora incerto viene considerato **negativo**.

I campioni sono **negativi**, se l'assorbanza risulta inferiore del Cut-Off almeno del 10 %.

#### 9.3.1. Risultati in unità NovaTec [NTU]

Assorbanza media del campione x 10  
Cut-Off = [unità NovaTec = NTU]

Esempio:  $\frac{1.216 \times 10}{0.38} = 32 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off : 10 NTU  
Dubbio: 9-11 NTU  
Negativo: <9 NTU  
Positivo: >11 NTU

## 10. CARATTERISTICHE DEL TEST

---

### 10.1. Precisione

| Interdosaggio | n  | Media | Cv (%) |
|---------------|----|-------|--------|
| Siero pos.    | 14 | 0.76  | 4.1    |

| Intradosaggio | n | Media | CV (%) |
|---------------|---|-------|--------|
| Siero pos.    | 8 | 1.06  | 8.6    |

### 10.2. Specificità diagnostica

La specificità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato negativo in assenza di anticorpi specifici. La specificità diagnostica è pari a 98.8%.

### 10.3. Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica è la probabilità del test di fornire un risultato positivo in presenza di anticorpi specifici. La sensibilità diagnostica è pari a 93%.

### 10.4. Possibili interferenze

Campioni emolitici, lipidici ed itterici contenenti fino a 10 mg/mL di emoglobina, 5 mg/mL di trigliceridi e 0,2 mg/mL di bilirubina non hanno presentato fenomeni di interferenza nel presente test.

Nota: I risultati si riferiscono al gruppo di campioni realizzati, questi non sono specifiche garantite.

## 11. LIMITAZIONI

---

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze. La diagnosi di una malattia infettiva non deve essere fatta soltanto sulla risultanza di un unico test. È importante considerare anche l'anamnesi ed i sintomi del paziente. I risultati del test da pazienti immunosoppressi e neonati hanno un valore limitato. Il risultato negativo non esclude la possibilità di essere infetto dal virus. Specialmente all'inizio dell'infezione è possibile che la presenza di anticorpi nel siero sia insufficiente per una determinazione esatta. Se vi è il sospetto clinico si raccomanda di ripetere il test dopo 2-3 settimane con un campione nuovo. Si raccomanda di verificare i risultati positivi con un altro metodo di determinazione. Con l'uso di antigeni ricombinanti si escludono quasi completamente le reazioni incrociate con i seguenti microorganismi:

Treponema pallidum

Borrelia recurrentis

Leptospira

Si raccomanda di escludere un'infezione da sifilide, poiché talvolta si sono ritrovati anticorpi contro p41i. A causa di un'infezione da Mononucleosi (Epstein-Barr) è possibile che si verifichi una stimolazione dei linfociti B che può generare una reazione poco specifica per la determinazione degli anticorpi IgM. Si raccomanda di escludere un'infezione da Epstein-Barr in caso di un risultato lievemente positivo (IgM) e un quadro clinico poco specifico.

## 12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

---

- In ottemperanza all'articolo 1, paragrafo 2 della direttiva Europea 98/79/EC, l'uso dei diagnostici medici in vitro è inteso da parte del produttore ad assicurare la congruenza, le prestazioni e la sicurezza del prodotto. Di conseguenza la procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i componenti di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg. Nonostante ciò e tutti i materiali devono comunque essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Non scambiare reagenti e micropiastre di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto attrezzatura pulita.
- Non scambiare i tappi dei flaconi.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti.
- Il NovaLisa™ ELISA è previsto soltanto per essere impiegato da parte di personale specializzato che conosce perfettamente le tecniche di lavoro.

**ATTENZIONE:** Bronidox L, nella concentrazione usata, mostra quasi assenza di tossicità sulla pelle e sulle mucose.

**ATTENZIONE:** L'acido solforico irrita occhi e pelle! Dopo il contatto sciacquare immediatamente e abbondantemente. Contattare un medico.

### 12.1. Smaltimento

In genere tutte le sostanze chimiche vengono considerate rifiuti tossici. Lo smaltimento viene regolato da leggi nazionali. Per ulteriori informazioni contattare l'autorità locale.

## 13. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

---

Numero del prodotto: BORM0040 Borrelia burgdorferi IgM-ELISA (96 determinazioni)

## 1. INTRODUCCIÓN

Las espiroquetas son bacterias gramnegativas móviles de forma espiral que son desproporcionadamente largas (hasta 250µm) en comparación con su diámetro (0,1-3µm). Todas las especies patógenas pertenecen a la familia de las Treponemataceae que incluyen tres géneros: Treponema, Borrelia y Leptospira.

Las Treponemas son bacterias delgadas, flexibles, normalmente con una forma espiral característica. Las Borrelias son las más largas espiroquetas de las Treponemataceae con espirales delicadas e irregulares. Borrelia burgdorferi es el causante de la enfermedad inflamatoria persistente tardía de Lyme que se reportó por primera vez en 1975 en el pueblo de Old Lyme, en el estado de Connecticut (Estados Unidos). La enfermedad se transmite sobre todo por la picadura de la garrapata, posiblemente también por otros insectos sanguijuelos. La propagación es a nivel mundial. Una prevención verdadera no existe. En Europa aprox. entre el 10 y el 20 % de las garrapatas están infectadas con Borrelia burgdorferi. El espacio vital son las regiones forestales, húmedas-calientes de norte América, Europa, norte de África, Australia y Japón. La población de mayor riesgo son obreros forestales, cazadores y agricultores.

Es una enfermedad difícil de diagnosticar ya que los síntomas se parecen a los de otras enfermedades. Generalmente aparece una erupción roja característica en el sitio de la picadura que puede pasar inadvertida. La enfermedad terciaria se desarrolla meses o años después de la infección inicial. Sólo el diagnóstico temprano posibilita un control eficaz de la enfermedad con antibióticos debido a que en la fase crónica las borrelias son casi inaccesibles.

| Especies             | Enfermedad  | Síntomas   | Vía de transmisión   |
|----------------------|---|--|--|
| Borrelia burgdorferi | Enfermedad de Lyme<br><br>Infecciones genito-uritarias<br><br>Otras infecciones | Erytema cronicum migrans, lesiones cutáneas, cardiológicos, neurológicas y musculoesqueléticas | Picadura de garrapatas infectadas por Borrelia burgdorferi (Ixodes dammini, USA; Ixodes ricinus, Europa) |

La infección puede ser detectada por:

- Microscopía: Frotis de sangre colorados de Giemsa o Wright
- PCR
- Serología: Detección de anticuerpos a través de IF, ELISA

## 2. USO PREVISTO

El ensayo inmunoenzimático de Nova Tec se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Borrelia burgdorferi en suero o plasma (citrito) humano y LCR (líquido cefalorraquídeo).

Para la determinación de anticuerpos IgG producidos de manera intratecal, una instrucción separada para el uso de líquido cefalorraquídeo (LCR) se puede obtener en NovaTec.

## 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Borrelia burgdorferi se basa en la técnica del ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay). El componente principal de los flagelos de B. burgdorferi es la flagelina (41 kDA, p41). Esta proteína junto con la lipoproteína específica **OspC** de la membrana exterior induce la forma temprana de anticuerpos en la fase I de la enfermedad (Erytema cronicum migrans). Los marcadores específicos de la especie, p100 y p18 son muy seguros en detectar la respuesta IgM, p18 es responsable para la alta sensibilidad. Se usa de forma adicionalmente el antígeno p41i para evitar reacciones cruzadas con sueros sífilíticos. Este testkit contiene los epítopos **OspC** del filo B31 (B. sensu stricto), 20047 y T25 (B. garinii), **p100** y **p18** de PKO (B. arzelii) y **p41i** del filo Pbi (B. garinii).

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos contra Borrelia burgdorferi se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las tiras de micropocillos que se usan como fase sólida están recubiertas con antígenos específicos de Borrelia burgdorferi. Los anticuerpos existentes en la muestra se unen a los antígenos inmovilizados de la placa de microtitulación. El conjugado de anticuerpos IgM anti humano con peroxidasa de rábano, se une con los complejos antígeno-anticuerpo en muestras positivas. Estos complejos inmunológicos desarrollan una coloración azul después de incubarlos con sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La densidad óptica se mide con un lector de ELISA a 450nm.

## 4. MATERIALES

---

### 4.1. Reactivos suministrados

- **Microtiras (IgM) recubiertas de antígeno de Borrelia burgdorferi:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de Borrelia burgdorferi, en bolsa de aluminio.
- **Diluyente para IgM de la muestra\*\*\*:** 1 botella de 100ml de solución de tampón para diluir la muestra; contiene IgG anti-humana; pH 7.2 ± 0.2; color verde; listo para el uso; tapón blanco.
- **Solución de parada:** 1 botella de 15ml de ácido sulfúrico, 0.2mol/l, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **Solución de lavado (20x conc.)\*:** 1 botella de 50ml de una solución de tampón 20x concentrado para lavar los pocillos; pH 7.2 ± 0.2; tapa blanca.
- **Conjugado IgM anti-humano (Borrelia burgdorferi)\*\*:** 1 botella de 20ml de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa; color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
- **Solución de sustrato de TMB:** 1 botella de 15ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB); listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control positivo de IgM (Borrelia burgdorferi)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado.
- **Control cut-off de IgM ( Borrelia burgdorferi)\*\*\*:** 1 botella de 3ml; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado
- **Control negativo de IgM (Borrelia burgdorferi)\*\*\*:** 1 botella de 2ml; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado.

\* contiene 0.1% de Bronidox L después de diluir

\*\* contiene 0.2% Bronidox L

\*\*\* contiene 0.1% Catón

### 4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 soporte
- 1 hoja de instrucciones
- 1 hoja de resultados

### 4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro con filtros de 450/620 nm
- Incubadora/cámara húmeda con termostato
- Dispositivo de lavado manual o automático
- Micropipetas con jeringuillas desechables (10, 100, 200, 1000 µl)
- Mezcladora Vortex
- Tubos de plástico desechables
- Gradilla para los tubos
- Agua destilada
- Cronómetro

## 5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

---

El test tiene que estar almacenado de 2...8°C. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de las botellas y en el exterior.

## 6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

---

*Todos los reactivos, las muestras y los controles tienen que estar a la temperatura ambiente (20...25°C) antes de ser utilizados!*

### 6.1. Tiras reactivas

Las tiras separables recubiertas con antígeno de Borrelia burgdorferi. Los pocillos listos para ser utilizados tienen que estar almacenados de 2...8°C. *Mantener los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio junto con el desecante y conservar de 2...8°C. El producto se conserva hasta la fecha de caducidad indicada.*

### 6.2. Conjugado de IgM anti-humano (Borrelia burgdorferi)

La botella contiene 20ml de una solución de IgM anti-humano conjugada con peroxidasa de rábano, tampón, estabilizadores, conservante y un colorante rojo inerte. La solución está lista para ser utilizada y tiene que estar almacenada de 2...8°C. *Después de la primera abertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si esta almacenado de 2...8°C.*

### 6.3. Controles

Las botellas de los controles contienen de solución de control listas para ser utilizadas. Las soluciones tienen que estar almacenadas de 2...8°C y contienen 0.1% de Catón. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

### 6.4. Diluyente de muestra IgM

La botella contiene 100ml de tampón de fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante verde inerte se utiliza para la dilución de la muestra del paciente. La solución contiene anticuerpos del tipo IgG anti-humanos para eliminar la inhibición competitiva de los anticuerpos de la clase IgG específicos y para retirar el factor reumatoide. Esta solución lista para ser utilizada ha de almacenarse entre 2...8°C. La solución se usa para diluir las muestras. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado entre 2...8°C.*

### 6.5. Solución para lavar (20x conc.)

La botella contiene 50ml de tampón concentrado, detergentes y conservantes. El contenido se diluye con un litro de agua destilada (1+19). La solución diluida es estable 5 días a temperatura ambiente. *La cristalización en el concentrado desaparece al calentarla a 37°C y mezclarla bien antes de usarla. Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

### 6.6. Solución de TMB

La botella contiene 15ml de una mezcla de tetrametilbenzidina con peróxido de hidrógeno. La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C protegida de la luz. *La solución es levemente azulada. En caso de contaminación cambia a una coloración azul más intensa no pudiendo ser utilizada en el ensayo.*

### 6.7. Solución de parada

La botella contiene 15ml de 0.2 M de ácido sulfúrico (R36/38, S26). La solución lista para ser utilizada se tiene que almacenar entre 2...8°C. *Después de la primera apertura, el producto se conserva hasta la fecha de caducidad si está almacenado de 2...8°C.*

## 7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

---

Usar muestras de suero o plasma (citrato) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas de 2...8°C, en caso contrario hay que congelarlas (-20°C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

### 7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1+100 con el tampón de dilución para la muestra de IgM, p.e. 10µl de la muestra con 1ml de tampón, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

## 8. PROCEDIMIENTO

---

### 8.1. Preparación del ensayo

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido para el método manual. Para excluir efectos de lavado en caso de utilizar los automáticos ELISA eleva el número de lavado de 3 a 5 veces y el volumen de solución de lavado de 300 µl a 350 µl. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los controles en la hoja de resultados suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos en el soporte.

En este caso por lo menos

|            |              |                           |
|------------|--------------|---------------------------|
| 1 pocillo  | (z.B. A1)    | para el blanco,           |
| 1 pocillo  | (z.B. B1)    | para el control negativo, |
| 2 pocillos | (z.B. C1+D1) | para el control cut-off y |
| 1 pocillo  | (z.B. E1)    | para el control positivo  |

*Para mayor seguridad es necesario hacer doble ensayo de controles y muestras del paciente.*

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1°C

1. Pipetear 100 µl de controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. Incubar **1 h ± 5 min a 37°C.**

- Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300µl de la solución de lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El tiempo entre cada lavado y cada aspiración tiene que ser por lo menos de 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.

*Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado provoca una mala precisión y resultados erróneamente aumentados!*

- Pipetar 100µl de conjugado anti-IgM (Borrelia burgdorferi) en cada pocillo con excepción del blanco. Cubrir con una lámina adhesiva.
  - Incubar 30 min a la temperatura ambiente (20...25°C).** Evitar la luz solar directa.
  - Repetir el lavado como en el paso numero 4.
  - Pipetar 100µl de sustrato de TMB en todos los pocillos.
  - Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 C).**
  - Pipetear en todos los pocillos 100µl de la solución de parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el sustrato de TMB. *Toda coloración azul formada durante la incubación se convierte en amarilla.*
- Nota: Muestras que son altamente positivas pueden causar precipitados negros del cromógeno! Estos precipitados influyen en los valores de las mediciones. Se recomienda diluir las muestras del paciente con solución salina 1+1. Después, preparar la muestra diluida con el tampón de dilución para la prueba de IgM 1+100. En este caso, el resultado se multiplica por 2.*
- Medir la extinción de la solución en cada pocillo con 450/620nm en un periodo de 30 min después de añadir la solución de parada.

## 8.2. Medición

Efectuar con ayuda del blanco en el pocillo **A1** la **calibración al cero** del fotómetro (lector de ELISA).

Para obtener resultados correctos, si la calibración no es posible por causas técnicas, hay que sustraer el valor de la extinción de la posición A1 del resto de los valores de extinción!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450nm** y anotar los resultados de los controles y de las muestras en la hoja de resultados.

*Es aconsejable la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620nm.*

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

## 9. CALCULO DE LOS RESULTADOS

### 9.1. Criterios de validez del ensayo

El ensayo es válido si se cumplen los siguientes criterios:

- Blanco** en A1 extinción **< 0.100**
- Control negativo** en B1 extinción **< 0.200 y < cut-off**
- Control cut-off** en C1 y D1 extinción **0,150 – 1,30**
- Control positivo** en E1 extinción **>cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

### 9.2. Calculo del valor de la medición

El *cut-off* se obtiene de los volores de la extinción de los dos controles Cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Cut-off Control + 0,44 OD Cut-off Control = 0,86:2 = 0,43

*Cut-off= 0,43*

### 9.3. Interpretación de los resultados

Las muestras se consideran positivas cuando el valor de la extinción es como mínimo mayor al 10% del valor del *cut-off*.

Las muestras con valores de extinción  $\pm 10\%$  del *cut-off* no pueden ser consideradas claramente positivas o negativas →

#### **Zona intermedia**

Se recomienda entonces repetir el ensayo con nuevas muestras del paciente de 2 a 4 semanas más tarde. Si de nuevo se encuentran resultados en la zona intermedia, la muestra tiene que estar valorada como **negativa**.

Las muestras se consideran **negativas** si el valor de la extinción esta por lo menos un 10% por debajo del *cut-off*.

### 9.3.1. Resultados en unidades Nova Tec [NTU]

$\frac{\text{Promedio de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-Off}} = [\text{NovaTec-Einheiten} = \text{NTU}]$

Ejemplo:  $\frac{1.204 \times 10}{0.43} = 28 \text{ NTU (NovaTec Units)}$

Cut-Off: 10 NTU  
Zona intermedia: 9-11 NTU  
Negativo: <9 NTU  
Positivo: >11 NTU

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 10.1. Precisión

| Inter ensayo | n  | Promedio | CV (%) |
|--------------|----|----------|--------|
| Suero pos.   | 14 | 0.76     | 4.1    |

| Intra ensayo | n | Promedio | CV (%) |
|--------------|---|----------|--------|
| Suero pos.   | 8 | 1.06     | 8.6    |

### 10.2. Especificad del ensayo

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia de la sustancia a analizar específicamente (98,8 %).

### 10.3. Sensibilidad del ensayo

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico (93 %).

### 10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas e ictericas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/ml para triglicéridos y de 0,2 mg/ml para bilirrubina.

*Los resultados están basados en pruebas de ensayos queales: No se trata de especificaciones garantizadas.*

## 11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

La contaminación bacteriana o repetidos ciclos de congelación-descongelación de la muestra pueden afectar a los valores de absorbancia. El diagnóstico de una enfermedad infecciosa no debe establecerse con base al resultado de una sola prueba. Un diagnóstico preciso debe tener en consideración historia clínica, sintomatología y datos serológicos. En pacientes inmunosuprimidos y neonatos los datos serológicos tienen valor limitado.

Un resultado negativo (IgG o IgM) no puede excluir una infección de B. burgdorferi. Especialmente en la fase inicial de la infección existe la posibilidad de que no se detecten anticuerpos. En el caso de que exista infección o resultado equivoco, se recomienda un nuevo muestreo después de 2-3 semanas. Un resultado positivo de IgG no siempre implica que exista una infección aguda ya que los anticuerpos de una infección anterior pueden persistir. El uso de antígenos recombinantes evita en gran medida reacciones cruzadas con los siguientes anticuerpos: Treponema pallidum, Leptospira, Borrelia recurrentis. Los anticuerpos de la infección de lues a p41i se determinaron ocasionalmente. Por lo tanto, una infección de lues debe ser excluida.

## 12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- En cumplimiento con el artículo 1 párrafo 2b de la directiva europea 98/79/EC, la utilización de sistemas médicos para diagnóstico in vitro tiene la intención por parte del fabricante de asegurar la adecuación, realizaciones y seguridad del producto. Por lo tanto, el procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG. No obstante, todos los materiales se deben considerar y tratar como potencialmente infecciosos.
- No intercambiar reactivos y placas de microtítulo de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.

- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Pipetear cuidadosamente las muestras y el conjugado en los pocillos para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados.
- El NovaLisa™ ELISA está pensado exclusivamente para su uso por personal especializado que domine perfectamente las técnicas de trabajo.

**ADVERTENCIA:** Bronidox L, en la concentración utilizada, casi no muestra riesgos tóxicos en la piel y en las mucosas.

**ADVERTENCIA:** El ácido sulfúrico irrita los ojos y la piel! En caso de contacto con los ojos lavar abundantemente con agua y consultar a un médico.

### 12.1. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

### 13. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

N° del producto: BORM0040 Borrelia burgdorferi IgM-ELISA (96 determinaciones)





## **BIBLIOGRAPHY / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

---






Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwaldt A.G., Brenner D.J. (1984) *Borrelia burgdorferi* sp.nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34, 496-497

Asbrink E., Hovmark A. (1988) Early and late cutaneous manifestations of Ixodes-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme Borreliose). *Ann NY Acad Sci* 539, 4-15

Karlson M., Hovind-Hougan K., Svenungsen B., Stiernsted G. (1990) Cultivation and characterization of Spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 28, 473-479

Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G. (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from human and ticks: Culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 112-118

Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Schierz G. (1990) Diagnostik der Lyme Borreliose. *Diagnose und Labor, Laboratoriumsblätter* 40, 24-36

| <b>Symbols Key/ Symbolschlüssel/ Legenda / Símbolos</b>                             |   |
|---|---|
|    | Manufactured by / Hergestellt von/ / Prodotto da/ Fabricado por   |
| <b>IVD</b>  | In Vitro Diagnostic Medical Device/ In Vitro Diagnosticum/ Diganostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro                   |
| <b>LOT</b>  | Lot Number/ Chargenbezeichnung/ Lotto/ Número de lote   |
|    | Expiration Date/ Verfallsdatum/ Scadenza/ Fecha de caducidad  |
|    | Storage Temperature/ Lagertemperatur/ Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento  |
| <b>CE</b>   | CE Mark/ CE-Zeichen/ Marchio CE/ MarcaCE  |
| <b>[REF]</b>  | Catalogue Number/ Katalog Nummer/ Numero di codice/ Número de Catálogo  |
|    | Consult Instructions for Use/ Gebrauchsanweisung beachten/ Consultare le istruzioni/ Consulte las Instrucciones de Uso                        |
| <b>MTP</b>  | Microplate/ Mikrotiterplatte/ Micropiastra/ Microplaca  |
| <b>CONJ</b>   | Conjugate/ Konjugat / Coniugato/ Conjugado  |
| <b>CONTROL -</b>  | Control serum, negative/ Kontrollserum, negative/ siero di controllo, negativo /Suero control negativo/ Soro de controle negativo             |
| <b>CONTROL +</b>  | Control serum, positive/ Kontrollserum, positiv/ siero di controllo, positivo/ Suero de control positivo                                      |
| <b>CUT OFF</b>  | Cut off control serum/ Cut off Kontrollserum/ siero di controllo, cut-off/ Suero control Cut-off  |
| <b>DIL G</b>  | Sample diluent buffer IgG/ IgG-Probenverdünnungspuffer/ soluzione tampone per i campioni IgG/ solución tampón para muestras IgG               |
| <b>SOLN STOP</b>  | Stop solution/ Stopplösung/ Soluzione bloccante   |
| <b>SUB TMB</b>  | TMB Substrate solution/ TMB-Substratlösung/ soluzione substrato TMB/ solución substrato TMB   |
| <b>WASHBUF<br/>20x</b>  | Washing solution 20x concentrated/ Waschlösung 20x konzentriert/ soluzione di lavaggio concentrazione x20/ solución de lavado concentrado x20 |
|  | Contains sufficient for "n" tests/ Ausreichend für "n" Tests/ Contenuto sufficiente per "n" saggi/ Contenido suficiente para "n" tests        |

# SCHEME OF THE ASSAY

Borrelia burgdorferi IgM-ELISA

## Assay preparation

Prepare reagents and samples as described.  
 Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls on the result sheet supplied in the kit.  
 Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

## Assay procedure

|  | Substrate blank<br>(e.g. A1) | Negative control | Positive control | Cut-off control | Sample<br>(diluted 1+100) |
|--|------------------------------|------------------|------------------|-----------------|---------------------------|
| Negative control   | -                            | 100µl            | -                | -               | -                         |
| Positive control   | -                            | -                | 100µl            | -               | -                         |
| Cut-off control  | -                            | -                | -                | 100µl           | -                         |
| Sample<br>(diluted 1+100)  | -                            | -                | -                | -               | 100µl                     |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 1 h at 37°C</b><br>Wash each well three times with 300µl of washing solution                |                              |                  |                  |                 |                           |
| Conjugate  | -                            | 100µl            | 100µl            | 100µl           | 100µl                     |
| Cover wells with foil supplied in the kit<br><b>Incubate for 30 min at room temperature</b><br>Wash each well three times with 300µl of washing solution |                              |                  |                  |                 |                           |
| TMB Substrate  | 100µl                        | 100µl            | 100µl            | 100µl           | 100µl                     |
| <b>Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark</b>   |                              |                  |                  |                 |                           |
| Stop Solution  | 100µl                        | 100µl            | 100µl            | 100µl           | 100µl                     |
| Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)   |                              |                  |                  |                 |                           |

## NovaTec Immundiagnostica GmbH

### Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6  
 D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760 Fax: +49 (0) 6074-487629

Email : info@NovaTec-ID.com

Internet: www.NovaTec-ID.com

BORM0040engl,dt,it,es-13012011-CR