

Borrelia burgdorferi

Lyme Blot Canine IgM

Immunoblot for the detection of IgM-class antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* in canine serum
Immunoblot zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Hundeserum

Only for in-vitro diagnostic use

English:	Page	2	to	6
Deutsch:	Seite	7	bis	11
Bibliography / Literatur	Page / Seite			14
Symbols Key / Symbolschlüssel	Page / Seite			15
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung	Page / Seite			16

Product Number: LYMV0110 (10 strips)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

Lyme disease is a tick-borne multistage disease which is caused by spirochetal bacteria of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex. In Europe *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* are the most frequently isolated pathogenic genomic species in man and dog.

Following the bite of an infected tick, the spirochetes undergo a rapid hematogenous dissemination and can affect organs, joints and muscles as well as the central and peripheral nervous system.

Clinical manifestations of canine Lyme disease include lethargy, fatigue and fever. Later stages are characterized by shifting leg lameness and arthritis. The characteristic rash or the circular area of redness around the bite (erythema chronicum migrans) which is seen in man may be absent or is overlooked due to hair coat or dark pigmentation.

Today, the laboratory workup of Lyme disease relies on serological tests. The standard approach involves screening the patient's sample using a technology such as ELISA or IFA. Unfortunately, false-positive or false-negative results are not rare and a confirmatory test such as a Western Blot is mandatory to report a positive result.

The serological response to a *Borrelia* infection is complex as the delay in the development of detectable antibodies may vary in different individuals. Cross-reactivity of some *Borrelia* proteins with antigens from other bacteria is also well-known. The Western Blot technology is extremely useful in dissecting the immune response to *Borrelia* infections which develops gradually over a period of weeks to years and which involves the appearance of IgM and IgG antibodies directed against a number of *Borrelia*-associated proteins.

2. INTENDED USE

Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM is a qualitative assay for the detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* specific IgM antibodies in canine serum.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Proteins derived from *Borrelia garinii* were separated electrophoretically according to their molecular weight using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Following electrophoresis, the separated protein bands were transferred to a PVDF membrane. The antigen bearing membrane was blocked and cut into ready-to-use strips.

Diluted dog sera are incubated with the antigen strips. *Borrelia*-specific antibodies, if present, will bind to their target antigens. After washing, anti-dog IgM conjugated with horseradish peroxidase is added. At the end of a second incubation, unbound conjugate is removed by washing and aspiration. The bound conjugate is visualized by the addition of a chromogenic substrate. Strips are dried and analysed. Using the kit-specific template supplied with the kit, the position of the stained bands can be correlated with defined *Borrelia* antigens.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Borrelia garinii Antigen Strips (IgM):** 1 tube containing 10 consecutively numbered western blot strips coated with *Borrelia garinii* antigens.
- **Template:** 1 predeveloped control strip, kit-specific.
- **IgM Sample Diluent***:** 1 bottle containing 50 ml of buffer for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2; coloured yellow; ready to use; white cap.
- **Washing Solution (20x conc.)*:** 1 bottle containing 50 ml of a 20-fold concentrated buffer, pH 7.2 ± 0.2 for washing the Antigen Strips; white cap.
- **Lyme anti-dog IgM Conjugate**:** 1 bottle containing 12 ml of peroxidase labelled anti-IgM; coloured red, ready to use; black cap.
- **TMB Substrate-Solution Membrane:** 1 bottle containing 12 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB); ready to use; blue cap.

* contains 0.01 % Kathon after dilution

** contains 0.2 % Bronidox L

*** contains 0.1 % Kathon

4.2. Materials supplied

- 1 test protocol
- 1 result sheet
- 2 incubation trays

4.3. Materials and Equipment needed

- Vortex tube mixer
- Deionised or (freshly) distilled water
- Disposable tubes
- Shaking platform
- Micropipettes, 10 and 1000 µl
- Plastic tweezers for handling Antigen Strips
- Vacuum apparatus
- Timer
- Filter paper

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. Borrelia garinii Antigen Strips

The ready to use western blot strips are coated with Borrelia garinii antigens. Store at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C. Do not interchange strips from different kits!*

6.2. Lyme anti-dog IgM Conjugate

The bottle contains 12 ml of a solution with anti-dog IgM conjugated to 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 until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.3. IgM Sample Diluent

The bottle contains 50 ml phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert yellow dye. It is used for the dilution of the patient specimen. This ready to use solution has to be stored at +2...+8 °C. *After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.4. Washing Solution (20x conc.)

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 will keep for 5 days if stored at room temperature. *Crystals in the solution disappear by warming up to +37 °C in a water bath. After first opening the concentrate is stable until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

6.5. TMB Substrate-Solution Membrane

The bottle contains 12 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 to pale yellow in appearance. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away. After first opening stability until the expiry date when stored at +2...+8 °C.*

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Use dog serum 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!*

7.1. Sample Dilution

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

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the test protocol carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the test protocol as described. Perform all assay steps in the correct order and without any appreciable delays between the steps. A clean, disposable tip should be used for dispensing each sample.

1. Using tweezers, carefully remove the number of required strips from the tube and place them in the channels of the incubation tray.
2. Transfer 1 ml of diluted dog serum to the appropriate channel of the incubation tray. A new pipette tip must be used with each separate sample. Check that all Antigen Strips are **completely immersed** and, if needed, gently shake the tray or push

delicately the strips into the solution with a clean pipette tip. The **numbered side of the strip must face up**; antigens are bound to this side of the membrane.

3. Incubate the strips at room temperature for **60 min** on a shaking platform.
4. Wash procedure
 - Carefully aspirate the contents of each channel, add 1 ml of Washing Solution.
 - Place the incubation tray on the shaking platform for 5 min at room temperature.
 - Aspirate the contents of each channel and repeat the wash procedure two more times.
5. Add **1 ml** of IgM Conjugate to the appropriate channels and incubate at room temperature for **30 min** on the shaking platform.
6. Repeat step 4.
7. Add **1 ml** of chromogenic TMB Substrate-Solution Membrane to the appropriate channels and incubate for **10 min** at room temperature and under observation on the shaking platform.
CAUTION: DO NOT OVERDEVELOP. Some sera show excessive background staining of the strips. To avoid background, stop the reaction earlier by washing with deionised water.
8. Stop the reaction by aspirating the contents of each channel and rinse each strip with **1 ml** of deionised water. Place back the incubation tray on the shaking platform for 5 min. Repeat the 1 ml - 5 min rinse.
9. Remove the strips from the incubation tray and place them with the number face up on filter paper to dry (approximately 30 min at room temperature).

IMPORTANT: to prevent fading, the strips should be protected from exposure to light.

9. RESULTS

9.1. Interpretation of Results

Once dried, attach the strips to the result sheet using clear tape.

- The *Borrelia burgdorferi* Lyme Blot Canine IgM utilizes a kit-specific Template consisting of a developed Antigen Strip cut from the membrane used to prepare the Antigen Strips. This strip has been exposed to a positive control serum in order to exhibit bands representative of a Lyme infection. The corresponding protein bands are listed on the right side of the Template.
- Identification of the reactive bands is based upon comparison with the exposed bands on the Template. The horizontal line at the bottom of the strip must be aligned with the index line near the bottom of the control strip.
- For band scoring, determine the reactivity of the following bands:
p100 (93 kDa), flagellin (41 kDa), BmpA (39 kDa), OspA (32.5 kDa), OspC (22-23 kDa) and p18 (18 kDa).

9.2. Band Specificity

Band	Antigen Characterization and Relevance
p100 (93 kDa)	chromosomal protein highly specific of the <i>Borrelia</i> genus; the antibody response is mostly IgG and appears in the course of chronic infections; bands at 93 kDa are strongly associated with advanced stages of Lyme disease
75 kDa	specific marker, probably corresponding to the bacterial DNA
62-72 kDa	heat shock proteins; these bands are not specifically associated with a <i>Borrelia</i> infection and are found in several bacterial infections; no diagnostic value
66 kDa	species-dependant but specific marker for <i>Borrelia</i> infections
60 kDa	common bacterial antigen; non-specific; no diagnostic value
58 kDa	species-dependant but specific marker for <i>Borrelia</i> infections
flagellin (41 kDa)	flagellin; cross-reaction with other spirochetes are common; a flagellin positive reaction may occur both at early and late stages

BmpA (39 kDa)	Borrelial membrane protein A; a protein highly specific of the Borrelia genus; detectable at all stages of infection
37 kDa	this protein is considered to be an early marker but its specificity has not been established
OspA (32.5 kDa)	Outer surface protein A; surface protein highly specific of Borrelia garinii; detectable at late stages
OspC (22-23 kDa)	Outer surface protein C; surface protein highly specific of Borrelia garinii; characteristic of the early phases of infection; important IgM marker
18 kDa	the specificity of this protein has been recently established; excellent marker for late infections

Dog sera may exhibit other bands than those mentioned above. Such bands should not be considered when interpreting the results.

9.3. Evaluation of Antigen Bands

- Before analyzing the bands, two questions have to be addressed:
 1. Is the animal frequently exposed to tick bites? If this is the case, the blot will automatically show several specific bands even in the absence of an ongoing infection. Other serological tests will probably be positive and a complete analysis of the western blot bands will be needed to differentiate between a past exposure and an ongoing infection. In contrast, dogs which are not exposed to tick bites will show immunoblots, when negative, with very few bands (most frequent bands: 60 and 41 kDa).
 2. Is the clinical presentation suggestive of a borreliosis? In the absence of fever and/or lameness, distinguishing between a past exposure and an ongoing infection may be extremely difficult.
- Overall presentation of the strip: IgM positive blots almost invariably display flagellin (p41) and OspC (22-23 kDa) bands, sometimes OspA (32.5 kDa). Positive blots are very similar to the control strip on the kit Template.

IMPORTANT: only intense flagellin (p41) bands are significant, whereas faint bands are common in the normal population.

Point Evaluation of Borrelia antigens in Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM

Borrelia Antigen	Molecular Weight [kDa]	Points IgM
p100	93	1
flagellin	41	1
BmpA	39	3
OspA	32.5	3
OspC	22-23	7
p18	18	2

- Sum up the points for each patient specimen and interpret as follows:

Sum of points	Evaluation IgM
≤ 5	negative
6	equivocal
≥ 7	positive

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The absence of antibodies reactive with Borrelia antigens on the Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM cannot exclude a Borrelia infection in all cases. In the early phase of infection, detectable amounts of antibodies may not or not yet be present. In addition, antibiotic therapy in early stages of infection can suppress the formation of antibodies.

The presence of antibodies specific for Borrelia antigens does not necessarily indicate an acute infection since high IgM titers of a previous infection can possibly persist for several months.

Serological results should not be used as the sole criterion on which a diagnosis is established. They are an aid to diagnosis only, and their significance must be interpreted in relationship to the clinical presentation of the animal. In the case of unclear or equivocal findings, repeated testing extending over several weeks is recommended.

11. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kits 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.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials should be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents from different production lots or Antigen Strips from different kits.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after the 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 reagent vials for microbial contamination prior to further use.
- Always use tweezers to handle Antigen Strips.
- During incubations and washing, the Antigen Strips must remain completely covered with fluid and the numbered side of the strips must face up.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The NovaTec Blot 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.
-----------------	---

11.1. 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.

12. ORDERING INFORMATION

Prod. No.: LYMV0110 Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM (10 strips)

DEUTSCH

1. EINLEITUNG

Die Lyme-Borreliose ist eine durch Zecken übertragene mehrstufige Krankheit, die durch Bakterien des Komplexes *Borrelia burgdorferi sensu lato* aus der Gruppe der Spirochäten verursacht wird. Die in Europa am häufigsten isolierten pathogenen Genomspesies bei Mensch und Hund sind *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi sensu stricto*.

Nach dem Stich einer infizierten Zecke können sich die Borrelien über den Blutkreislauf im gesamten Organismus ausbreiten und Organe, Gelenke und Muskeln sowie das zentrale und periphere Nervensystem befallen.

Die Borreliose äußert sich beim Hund meist unspezifisch mit Bewegungsunlust, Mattigkeit oder Fieber. Im späteren Stadium kommt es häufig zu wechselnden Lahmheiten und Arthritiden. Das für den Menschen so typische Anfangsstadium mit einer deutlichen Hautrötung um die Stichstelle (*Erythema chronicum migrans*) kann fehlen oder wird wegen des Fells oder dunkler Hautpigmentierung selten bemerkt.

Die Routine-Diagnostik der Lyme-Borreliose stützt sich auf serologische Untersuchungen. Als Screening-Tests kommen standardmäßig immunologische Verfahren wie ELISA oder IFA zum Einsatz. Da falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse nicht selten sind, muss ein positives Ergebnis durch einen Bestätigungstest wie z.B. einen Western-Blot abgesichert werden.

Die serologische Antwort auf eine Borrelien-Infektion ist vielschichtig, da in verschiedenen Individuen die Zeit bis zur Bildung detektierbarer Antikörpermengen variieren kann. Weiterhin ist bekannt, dass Kreuzreaktivitäten zwischen einigen Borrelien-Proteinen und Antigenen anderer Bakterien auftreten. Der Western-Blot erweist sich für die Analyse der Immunabwehr, die sich schrittweise über eine Periode von Wochen bis Jahren entwickelt und das Auftreten von IgM- und IgG-Antikörpern gegen eine Reihe Borrelien-assoziiierter Proteine beinhaltet, als sehr hilfreich.

2. VERWENDUNGSZWECK

Der NovaTec *Borrelia burgdorferi* Lyme Blot Canine IgM ist ein qualitativer Test zum Nachweis *Borrelia burgdorferi sensu lato* spezifischer IgM-Antikörper in caninem Serum.

3. TESTPRINZIP

Proteine aus *Borrelia garinii* wurden elektrophoretisch gemäß ihrem Molekulargewicht mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran übertragen, unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Membran in gebrauchsfertige Streifen geschnitten.

Verdünte Hundeseren werden mit den Antigen-Streifen inkubiert. Sind *Borrelia garinii*-spezifische Antikörper vorhanden, binden diese an ihre auf der Membran fixierten Ziel-Antigene. Nicht-gebundene Serumkomponenten werden durch einen Waschschritt entfernt. In einem zweiten Reaktionsschritt reagieren Antigen-Antikörper-Komplexe spezifisch mit anti-canine IgM-Antikörpern, die an Meerrettichperoxidase gekoppelt sind. Am Ende der zweiten Inkubation wird nicht-gebundenes Konjugat durch Waschen entfernt. Gebundenes Konjugat wird durch die Zugabe eines chromogenen Substrats sichtbar gemacht. Nach dem Trocknen können die gefärbten Antigenbanden anhand der mitgelieferten kitspezifischen Schablone identifiziert werden.

4. MATERIALIEN

4.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Borrelia garinii Antigen-Streifen (IgM):** 1 Röhrchen mit 10 fortlaufend nummerierten Western-Blot-Streifen, beschichtet mit *Borrelia garinii* Antigenen.
- **Schablone:** 1 vorentwickelter Kontrollstreifen, kitspezifisch.
- **IgM-Probenverdünnungspuffer***:** 1 Flasche mit 50 ml Puffer zur Probenverdünnung; pH 7.2 ± 0.2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe.
- **Waschlösung (20x konz.):*** 1 Flasche mit 50 ml eines 20-fach konzentrierten Puffers zum Waschen der Antigen-Streifen, pH 7.2 ± 0.2; weiße Verschlusskappe.
- **Lyme anti-canine IgM-Konjugat**:** 1 Flasche mit 12 ml Peroxidase-konjugiertem Antikörper gegen Hunde IgM; rot gefärbt, gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe.
- **TMB Substrat-Lösung Membran:** 1 Fläschchen mit 12 ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB); gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe.

* enthält 0.01 % Kathon nach Verdünnung

** enthält 0.2 % Bronidox L

*** enthält 0.1 % Kathon

4.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 Arbeitsanleitung
- 1 Ergebnisblatt
- 2 Inkubationswannen

4.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Vortex-Mischer
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch
- Kippschüttler
- Mikropipetten mit Einmalspitzen, 10 und 1000 µl
- Plastik-Pinzette
- Absaugsystem mit Desinfektionsfalle
- Timer
- Filterpapier

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. Borrelia garinii Antigen-Streifen

Die Western-Blot-Streifen sind mit Borrelia garinii Antigenen beschichtet. *Die gebrauchsfertigen Streifen sind bei +2...+8 °C aufzubewahren. Haltbarkeit bis zum angegebenen Verfallsdatum. Antigen-Streifen verschiedener Kits nicht untereinander austauschen!*

6.2. Lyme anti-canine IgM-Konjugat

Die Flasche enthält 12 ml einer Lösung von anti-canine-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. IgM-Probenverdünnungspuffer

Die Flasche enthält 50 ml Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten gelben Farbstoff. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C aufzubewahren. Die Lösung wird für die Verdünnung der Proben eingesetzt. *Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.4. 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 haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

6.5. TMB Substrat-Lösung Membran

Das Fläschchen enthält 12 ml eines Tetramethylbenzidin/Wasserstoffperoxidgemisches. Die gebrauchsfertige Lösung ist bei +2...+8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. *Die Lösung ist farblos bis leicht gelblich. Sollte die Lösung nach blau umschlagen, ist sie kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden. Nach dem ersten Öffnen haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum (bei +2...+8 °C).*

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es sollten Hunde-Serumproben 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!*

7.1. Probenverdünnung

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

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Gebrauchsinformation vor Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Arbeitsanleitung genau zu befolgen. Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen. Für jeden Proben-Pipettierschritt saubere Einmalspitzen verwenden.

1. Anzahl benötigter Antigen-Streifen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus dem Röhrchen entnehmen und jeweils in eine separate Rinne der Inkubationswanne geben.

2. 1 ml verdünntes Hundeserum in die entsprechende Rinne der Inkubationswanne pipettieren. Für jede Probe muss eine neue Pipettenspitze verwendet werden. Alle Antigen-Streifen müssen **vollständig untergetaucht** sein. Wenn nötig, die Wanne sanft schütteln oder die Streifen mit einer sauberen Pipettenspitze vorsichtig in die Lösung schieben. Die **Nummerierung muss nach oben zeigen**, auf dieser Seite sind auch die Antigene gebunden.
3. Streifen bei Raumtemperatur für **60 min** auf einem Kippschüttler inkubieren.
4. Waschen
 - Flüssigkeit aus jeder Rinne sorgfältig absaugen, 1 ml Waschlösung zugeben.
 - 5 min auf dem Kippschüttler bei Raumtemperatur inkubieren.
 - Flüssigkeit aus jeder Rinne absaugen und Waschvorgang noch zweimal wiederholen.
5. **1 ml** IgM-Konjugat in die entsprechenden Rinnen geben und für **30 min** bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
6. Waschvorgang gemäß Punkt 4 wiederholen.
7. **1 ml** der chromogenen TMB Substrat-Lösung Membran zugeben und **10 min** auf dem Schüttler bei Raumtemperatur und unter Beobachtung inkubieren.

ACHTUNG: NICHT ÜBERENTWICKELN. Bei einigen Seren kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In diesem Fall ist die Farbreaktion vorzeitig durch Spülen mit deionisiertem Wasser zu stoppen.
8. Reaktion durch Absaugen der Flüssigkeit abstoppen und jeden Streifen mit **1 ml** deionisiertem Wasser waschen. Antigen-Streifen 5 min unter Schütteln inkubieren, Wasser absaugen und den Waschschritt wiederholen.
9. Streifen aus der Inkubationswanne nehmen und mit der Nummerierung nach oben auf Filterpapier trocknen (etwa 30 min bei Raumtemperatur).

WICHTIG: die Streifen sollten vor Licht geschützt aufbewahrt werden, um ein Ausbleichen zu verhindern.

9. ERGEBNISSE

9.1. Interpretation der Ergebnisse

Nach dem Trocknen Streifen mit durchsichtigem Klebeband auf das Ergebnisblatt kleben.

- Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM enthält eine kitspezifische Schablone mit einem entwickelten Kontrollstreifen. Dieser Streifen stammt aus derselben Membran, die zur Herstellung der Antigen-Streifen verwendet wurde. Er wurde mit einem positiven Kontrollserum inkubiert, um Lyme-Borreliose repräsentative Banden anzuzeigen. Relevante Proteinbanden sind rechts neben dem Streifen aufgeführt.
- Für die Probenauswertung wird der entwickelte Kontrollstreifen auf der Schablone herangezogen. Dazu muss die Index-Linie des Kontrollstreifens an die horizontale Linie am unteren Rand des Teststreifens angelegt werden.
- Zur Bewertung einer Probe wird die Reaktivität für folgende Banden bestimmt:
p100 (93 kDa), Flagellin (41 kDa), BmpA (39 kDa), OspA (32.5 kDa), OspC (22-23 kDa) und p18 (18 kDa).

9.2. Spezifität der Antigenbanden

Bande	Charakterisierung der Antigene und ihre Relevanz
p100 (93 kDa)	chromosomal kodiertes Protein, hoch-spezifisch für das Genus Borrelia; hauptsächlich IgG-Antikörper im Verlauf chronischer Infektionen; Banden bei 93 kDa sind typisch für fortgeschrittene Stadien der Lyme-Borreliose
75 kDa	spezifischer Marker; wahrscheinlich zur bakteriellen DNA gehörend
62-72 kDa	Hitzeschock-Proteine; Banden nicht spezifisch für Borrelien-Infektionen, treten häufig auch bei anderen bakteriellen Infektionen auf; kein diagnostischer Nutzen
66 kDa	spezies-abhängiger aber spezifischer Marker für Borrelien-Infektionen
60 kDa	verbreitetes bakterielles Antigen; nicht-spezifisch; kein diagnostischer Nutzen
58 kDa	spezies-abhängiger aber spezifischer Marker für Borrelien-Infektionen
Flagellin (41 kDa)	Flagellin-Protein; Kreuzreaktion mit anderen Spirochäten ist häufig; positive Reaktion kann sowohl in frühen als auch späten Stadien auftreten

BmpA (39 kDa)	Borrelien Membran-Protein A; hoch-spezifisch für das Genus Borrelia; nachweisbar in allen Stadien der Infektion
37 kDa	gilt als früher Marker, Spezifität allerdings nicht gesichert
OspA (32.5 kDa)	Outer surface protein A; Oberflächenprotein hochspezifisch für Borrelia garinii; erscheint in späten Stadien
OspC (22-23 kDa)	Outer surface protein C; Oberflächenprotein hoch-spezifisch für Borrelia garinii; erscheint früh während der Infektion; wichtiger IgM-Marker
18 kDa	die Spezifität dieses Proteins wurde kürzlich nachgewiesen; ausgezeichneter Marker für späte Infektionen

Hundeseren können weitere Banden zu den oben erwähnten aufweisen. Solche Banden sollten nicht in die Testinterpretation einfließen.

9.3. Bewertung der Antigenbanden

- Vor der Bewertung der Banden müssen folgende Aspekte berücksichtigt werden:
 1. Ist das Tier häufig Zeckenstichen ausgesetzt? In diesem Fall kann der Blot auch in Abwesenheit einer aktuellen Infektion spezifische Banden aufweisen. Andere serologische Tests werden wahrscheinlich positiv sein und eine komplette Analyse der Western-Blot-Banden ist erforderlich, um zwischen einer früheren Exposition und einer laufenden Infektion zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu werden negative Seren von Hunden, die keinen Zeckenstichen ausgesetzt sind, nur sehr wenige Banden im Immunoblot zeigen (häufigste Banden: 60 und 41 kDa).
 2. Deutet das klinische Erscheinungsbild auf eine Borreliose hin? In Abwesenheit von Fieber und/oder Lahmheit kann eine Differenzierung zwischen einem vorausgegangenen Kontakt und einer gerade ablaufenden Infektion äußerst schwierig sein.
- Im Frühstadium der Infektion richtet sich die Immunantwort nur gegen wenige Borrelien-Proteine: positive Streifen zeigen fast ausnahmslos Reaktivitäten gegen Flagellin (p41) und OspC (22-23 kDa) sowie manchmal OspA (32.5 kDa). Positive Blots ähneln dem Kontrollstreifen auf der mitgelieferten Schablone.

WICHTIG: nur starke Flagellin-Banden (p41) sind aussagekräftig, schwache Banden sind weit verbreitet.

Punkte-Bewertung der Borrelien-Antigene im Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM

Borrelien-Antigen	Molekulargewicht [kDa]	Punkte IgM
p100	93	1
Flagellin	41	1
BmpA	39	3
OspA	32.5	3
OspC	22-23	7
p18	18	2

- Punkte für jede Probe addieren und wie folgt auswerten:

Summe der Punkte	Bewertung IgM
≤ 5	negativ
6	fraglich
≥ 7	positiv

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Abwesenheit von Antikörpern gegen Borrelien-Antigene im Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM kann eine Borrelien-Infektion nicht in jedem Fall ausschließen. In der Frühphase der Infektion können Antikörper noch nicht oder in nicht detektierbarer Menge vorhanden sein. Ebenso kann eine Antibiotika-Therapie im Frühstadium der Infektion die Antikörperbildung supprimieren. Die Anwesenheit von Antikörpern gegen Borrelien-Antigene im Lyme Blot Canine IgM muss nicht in jedem Fall eine akute Infektion anzeigen, da IgM-Antikörper-Titer einer früheren Infektion u. U. über Monate persistieren können. Eine Interpretation des Ergebnisses sollte nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Bei unklaren oder fraglichen serologischen Ergebnissen können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind 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.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Reagenzien unterschiedlicher Chargen und Antigen-Streifen verschiedener Kits 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 Reagenzien-Fläschchen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Antigen-Streifen vorsichtig mit einer Pinzette handhaben.
- Während der Inkubations- und Waschschrte müssen die Antigen-Streifen vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die nummerierte Seite muss nach oben zeigen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten Patientenproben und Konjugat sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der NovaTec Blot ist nur für die Anwendung durch Fachpersonal vorgesehen, welches die Arbeitstechniken einwandfrei beherrscht.

WARNUNG:	Bronidox L zeigt in der verwendeten Konzentration nahezu keine toxikologischen Risiken an Haut bzw. Schleimhaut.
-----------------	--

11.1. 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.

12. BESTELLINFORMATIONEN

Produktnummer: LYMV0110 Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM (10 Bestimmungen)






BIBLIOGRAPHY / LITERATUR

Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P. (1982) Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? Science 216, 1317-1319

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

Hovius J.W.R., Hovius K.E., Oei A., Houwers D.J., van Dam A.P. (2000) Antibodies against Specific Proteins of and Immobilizing Activity against Three Strains of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Can Be Found in Symptomatic but Not in Infected Asymptomatic Dogs. J Clin Microbiol 38, 2611-2621

Guerra M.A., Walker E.D., Kitron U. (2000) Quantitative Approach for the Serodiagnosis of Canine Lyme Disease by the Immunoblot Procedure. J Clin Microbiol 38, 2628-2632

Symbols Key / Symbolschlüssel	
	Manufactured by / Hergestellt von
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum
LOT	Lot Number / Chargenbezeichnung
	Expiration Date / Verfallsdatum
	Storage Temperature / Lagertemperatur
[REF]	Catalogue Number / Katalog Nummer
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten
STRIP	Antigen-Strips / Antigen-Streifen
TEMP	Template / Schablone
CONJ	Conjugate / Konjugat
DIL G	Sample diluent buffer IgM / IgM-Probenverdünnungspuffer
SUB TMB	TMB Substrate-Solution Membrane / TMB-Substrat-Lösung Membran
WASH BUF 20x	Washing solution 20x concentrated / Waschlösung 20x konzentriert
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests

SCHEME OF THE ASSAY

Borrelia burgdorferi Lyme Blot Canine IgM

Test Preparation

Prepare samples as described.
Note sample and strip numbers as well as lot number and antibody isotype.
Put the required number of antigen strips into the wells of the incubation tray.
Prepare the required volume of Washing Solution.

Assay Procedure

pipette 1 ml diluted sample
↓
incubate for 60 min at room temperature while shaking gently
↓
wash three times for 5 min with 1 ml Washing Solution while shaking
↓
add 1 ml Conjugate
↓
incubate for 30 min at room temperature while shaking gently
↓
wash three times for 5 min with 1 ml Washing Solution while shaking
↓
add 1 ml Substrate-Solution
↓
incubate for 10 min at room temperature while shaking gently
↓
wash two times for 5 min with 1 ml deionised water
dry and read

NovaTec Immundiagnostica GmbH

Technologie & Waldpark

Waldstr. 23 A6
D-63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 (0) 6074-48760
Email: info@NovaTec-ID.com
Internet: www.NovaTec-ID.com

Fax: +49 (0) 6074-487629

LYMV0110engl,dt28072008-EH