

MASTAZYME™ BORRELIA

Enzymimmunoassay zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von humanen IgG / IgM-Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi in Serum und Plasma

Enzyme immunoassay for the detection and quantification of human IgG / IgM antibodies against Borrelia burgdorferi in serum and plasma

Gebrauchsinformation / Instructions for Use



Nur zur *in-vitro* Diagnostik / For *in vitro* diagnostic use only



Deutsch: Seiten 03–09



English: Pages 10–16

MASTAZYME™ BORRELIA IgG
MASTAZYME™ BORRELIA IgM

REF 680201
REF 680202

12 x 8 Tests
12 x 8 Tests

Lagerung / Storage / Conservation: 2–8 °C

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:

Explanations of abbreviations and icons used on labels:

| | | | |
|---|-------------|---|-----------------------------|
| STRIPS | | Mikrotiterstreifen | Microtiter strips |
| CONTR | + | Positive Kontrolle | Positive control |
| CONTR | - | Negative Kontrolle | Negative control |
| CAL | 1-4 | Kalibrator 1-4 | Calibrator 1-4 |
| CONJ | | HRP-Konjugat | HRP conjugate |
| DIL | | Probenverdünnungspuffer | Sample diluent |
| SUBS | | TMB-Substrat | TMB substrate |
| STOP | | Stopp-Lösung | Stopping solution |
| WASH | CONC | Waschpuffer, konzentriert | Washing buffer, concentrate |
| LOT | | Charge | Batch |
|  | | Gebrauchsinformation beachten | Read instructions for use |
|  | | Wichtige Hinweise beachten | Important notes |
|  | | Verfalldatum | Expiry Date |
|  | | Lagerung bei | Storage |
|  | | Reagenzien nicht zur Wiederbenutzung geeignet | Reagents not reusable |

| Inhalt | Seite |
|--|--------------|
| 1. Verwendungszweck | 4 |
| 2. Testprinzip | 4 |
| 3. Packungsinhalt | 4 |
| 4. Zusätzlich benötigte Materialien | 5 |
| 5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen | 5 |
| 6. Lagerung und Stabilität | 6 |
| 7. Probengewinnung und -handhabung | 6 |
| 8. Testdurchführung | 6 |
| 9. Auswertung und Interpretation | 7 |
| 10. Testcharakteristika | 8 |
| 11. Literatur | 9 |

1. Verwendungszweck

Der MASTAZYME™ BORRELIA dient dem Nachweis und der Quantifizierung von spezifischen IgG / IgM Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in Serum oder Plasma. Die Verwendung des ELISAs für andere Körperflüssigkeiten kann auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden. MASTAZYME™ BORRELIA ist nur zur *in-vitro* Diagnostik zu verwenden.

2. Testprinzip

Das Testprinzip der ELISAs kann in 4 Schritten beschrieben werden.

2.1 Seruminkubation und 1. Waschschnitt

Spezifische Antikörper bilden mit Antigen, das an die Festphase gebunden ist, einen stabilen Immunkomplex. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur werden unspezifisch gebundene Serumkomponenten durch Waschen entfernt.

2.2 Konjugatinkubation und 2. Waschschnitt

Meerrettich-Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG / IgM bindet an die entsprechenden Antikörper auf dem Festphasenantigen und bildet mit diesen einen stabilen Immunkomplex. Überschüssiges nicht gebundenes Konjugat wird nach der 30-minütigen Inkubation durch Waschen entfernt.

2.3 Substrat- und Stopreaktion

Nach Zugabe des TMB-Substrats wird dieses durch das Enzymkonjugat umgesetzt. Es entsteht eine bläuliche Färbung, deren Intensität mit der Menge der gebundenen Konjugatmoleküle korreliert. Nach 15 Minuten Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 N Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Die pH-Verschiebung führt zum Farbumschlag von blau nach gelb.

2.4 Auswertung

Die Reaktionsansätze können nun mit einem ELISA-Plattenreader bei 450 nm (empfohlene Referenzwellenlänge bei bichromatischer Messung: 600–690 nm) gemessen werden. Die Extinktion (OD) korreliert mit der Konzentration der spezifischen Antikörper.

Das Ergebnis kann aus einer Eichkurve abgelesen oder durch geeignete elektronische Kurvenberechnung (4-Parameter-Anpassung, Spline-Approximation o.ä.) ermittelt werden.

3. Packungsinhalt

Das Testkit enthält genügend Reagenzien für $12 \times 8 = 96$ Bestimmungen. Die Streifen der Mikrotitratterplatte sowie alle anderen Reagenzien sind bei 2–8 °C zu lagern. Das Verfallsdatum der einzelnen Komponenten ist auf den jeweiligen Etiketten vermerkt.

| | | |
|------------|------------------|--|
| 12 | Streifen | mit je 8 einzeln abbrechbaren Wells, beschichtet mit <i>B. burgdorferi</i> s. s.- / <i>B. afzelii</i> - / <i>B. garinii</i> -Antigen |
| 1 x | Rahmen | |
| 4 x 1,5 mL | Kalibratoren 1–4 | Stabilisiertes humanes Plasma, enthält antigenspezifische Antikörper, gebrauchsfertig |

| | Anti-Borrelia IgG Konzentration [U/mL] | Anti-Borrelia IgM Konzentration [U/mL] |
|------------------------|---|---|
| Kalibrator 1 | 1 | 1 |
| Kalibrator 2 (Cut-off) | 100 | 100 |
| Kalibrator 3 | 200 | 200 |
| Kalibrator 4 | 1600 | 800 |
| Positive Kontrolle | 400 | 400 |
| Negative Kontrolle | 50 | 50 |

| | | |
|------------|---------------------------|--|
| 1 x 1,5 mL | Negative Kontrolle | Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden |
| 1 x 1,5 mL | Positive Kontrolle | Stabilisiertes humanes Plasma, gebrauchsfertig, kann in die Kurve integriert werden |
| 2 x 60 mL | Probenverdünnungspuffer | PBS Puffer mit Konservierungsmittel, gebrauchsfertig |
| 1 x 12 mL | Enzymkonjugat | Meerrettich-Peroxidase markiertes Anti-Human-IgG / IgM (Ziege), gebrauchsfertig |
| 1 x 12 mL | TMB-Substrat | 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin, gebrauchsfertig |
| 1 x 12 mL | Stopplösung | 0,5 N H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure), gebrauchsfertig |
| 2 x 50 mL | Waschpuffer 10 x Konz. | PBS/Tween Puffer, vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnen, evtl. vor Gebrauch kurz auf 37 °C erwärmen, um mögliche Kristalle zu lösen |

4. Zusätzlich benötigte Materialien

- 5 µL-, 100 µL- und 500 µL-Pipetten oder Multipetten
- Photometer für Mikrotiterplatten mit 450 nm Filter (Referenzfilter 600–690 nm)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (bei manuellem Waschen: Waschflasche)
- Röhrchen für Serumverdünnungen
- Messzyylinder
- Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität

5. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Den Test nur zur *in-vitro* Diagnostik verwenden! Reagenzien nicht schlucken oder einatmen. Die Sicherheitsbestimmungen des Labors sind zu beachten. Im Labor darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Alle Seren und Plasmen sowie Puffer des Kits, die humanes Probenmaterial enthalten, wurden mit anerkannten Methoden auf HBsAg, HIV und HCV getestet und für negativ befunden. Da das Vorhandensein solcher Erreger trotzdem nicht völlig ausgeschlossen werden kann, sollten die Reagenzien wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.
- Serum- und Reagenzien-Kontaminationen sollten mit Desinfektionsmitteln gesäubert und der Abfall entsprechend entsorgt werden.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18–24 °C) gebracht werden.
- Vor der Verwendung sind die Reagenzien gut zu mischen. Heftiges Schütteln und Schaumbildung sind zu vermeiden.
- Beim Pipettieren ist auf gleiche Zeitintervalle zu achten, um für alle Testansätze gleiche Bedingungen zu gewährleisten.
- Beim Öffnen der Fläschchen ist eine Kontamination des Stopfens zu vermeiden. Um das Risiko möglicher Oxidationen zu minimieren, sind die Fläschchen nach Gebrauch sofort wieder zu verschließen.
- Um Verschleppungen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden, sind Einmal-Pipettenspitzen zu verwenden.
- Reagenzien verschiedener Kit-Chargen sollten nicht verwendet werden.
- Alle Reagenzien sind vor Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden.

- Gemäß den GLP (Good Laboratory Practice) oder entsprechenden Richtlinien sind alle Labgeräte regelmäßig auf Funktion und Präzision zu prüfen, dies gilt z. B. für die Pipetten, Waschgeräte und ELISA-Reader.
- Der Kontakt mit der Schwefelsäure enthaltenden Stopplösung und TMB-Substrat ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und gründlich mit Wasser abwaschen. Alle Geräte sofort nach Gebrauch sorgfältig reinigen.

6. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien bei 2–8 °C lagern.

Das Verfalldatum jedes Kitbestandteils ist auf dem entsprechenden Etikett vermerkt. Die Reagenzien nach Ablauf des Verfalldatums nicht weiter verwenden.

Verdünnter Waschpuffer kann bei 2–8 °C gelagert werden. Unter diesen Bedingungen kann er bis zu 4 Wochen verwendet werden. Er muss allerdings vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht werden.

Nach dem Öffnen ist das angebrochene Kit innerhalb von 3 Monaten zu verwenden.

7. Probengewinnung und -handhabung

Es kann sowohl Serum als auch Plasma (EDTA, Heparin) zur Bestimmung verwendet werden. Die Proben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Bei längerer Aufbewahrung Proben sofort nach Entnahme in Aliquots aufteilen und bei -20 °C einfrieren.

Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden!

Aufgetaute Proben sollten vor der Verwendung im Test gemischt (Vortex) werden.

Lipämische, ikterische oder hämolysierte Proben können falsche Ergebnisse ergeben.

Vor der Analyse müssen Patientenproben mit Probenverdünnungspuffer 1:101 (z. B. 5 µL Serum + 500 µL Probenverdünnungspuffer) verdünnt werden.

Zur Vermeidung von Störungen durch Rheumafaktoren können die Patientenproben mit MASTSORB™ (Kat.-Nr.: 651003) präabsorbiert werden. **Kalibratoren dürfen nicht absorbiert werden.**

8. Testdurchführung

8.1. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien und Proben mischen und auf Raumtemperatur (RT, 18–24 °C) bringen.

Waschpuffer: Beim Vorliegen von Salzkristallen das Konzentrat auf 37 °C erwärmen und nach Lösung der Kristalle mischen.

Das Waschpuffer-Konzentrat mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen (z. B. 50 mL Konzentrat + 450 mL dest. Wasser), mischen.

- Die Gebrauchsanweisung ist zu befolgen. Jegliche Abänderung oder Modifikation erfolgt in Verantwortung des Anwenders.
- Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Reagenzien sollten nur so lange wie nötig bei Raumtemperatur gelagert werden.
- Für die quantitative Auswertung ist mit jedem Testansatz eine Eichkurve zu erstellen.
- Nicht benötigte MP-Streifen sollten in der Hülle bei 2–8 °C trocken gelagert werden.

8.2. Testablauf

Hinweis: Es können andere als die empfohlenen Inkubationsbedingungen gewählt werden. Bei Abweichung vom vorliegenden Protokoll (z. B. Inkubationstemperatur 37 °C statt RT) ist der Anwender für die Validierung des Tests verantwortlich.

1. Je 100 µL der vorverdünnten (1:101) Patientenproben, gebrauchsfertigen Kalibratoren und Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
3. Platteninhalt verwerfen und Vertiefungen mit 3 x 300 µL gebrauchsfertigem Waschpuffer waschen. Rückstände von Waschpuffer sind durch Ausklopfen der Platten auf Fließpapier zu entfernen.
4. 100 µL Enzymkonjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
5. Streifen bei RT für 30 Minuten inkubieren.
6. Waschen wie unter Punkt 3. beschrieben.
7. 100 µL TMB-Substrat pipettieren.
8. Streifen bei RT für 15 Minuten im Dunkeln inkubieren.
9. Reaktion durch Zugabe von 100 µL Stopplösung beenden, ca. 5 Minuten stehenlassen.
10. Inhalt der Vertiefungen kurz mischen und anschließend bei 450 nm messen. Als Blank wird gegen Luft gemessen. Es wird empfohlen, als Referenzwellenlänge 600–690 nm zu verwenden. Die Konzentrationen können graphisch anhand der Eichkurve oder mittels Computersimulation berechnet werden.

Die entwickelte Farblösung sollte innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

9. Auswertung und Interpretation

Beispiel: IgG Kalibratorkurve (U/mL)

| | U/mL | OD 450 nm |
|--------------------|------|-----------|
| Kal. 1 | 1 | 0,006 |
| Kal. 2 (Cut-off) | 100 | 0,520 |
| Kal. 3 | 200 | 0,838 |
| Kal. 4 | 1600 | 2,009 |
| Positive Kontrolle | 400 | 1,328 |
| Negative Kontrolle | 50 | 0,356 |

Die obige Tabelle dient als Beispiel. Die Daten beschreiben keine Werte, die in anderen Laboratorien erhalten wurden. **Die Daten dürfen nicht zur Erstellung einer Eichkurve verwendet werden.**

9.1. Qualitative Auswertung

Die berechnete Absorption der Probe wird mit der des Cut-off Kalibrators verglichen. OD-Werte über dem Cut-off sind als positiv, Werte unterhalb der Cut-off OD als negativ zu bewerten.

Werte im Bereich der Cut-off OD ($\pm 10\%$) sind als Graubereich zu betrachten. Es wird empfohlen, die Bestimmung zu wiederholen oder 2–4 Wochen später eine neue Patientenprobe zu analysieren. In diesem Fall sollten beide Proben innerhalb eines Testlaufs untersucht werden.

9.2 Quantitative Auswertung

Die Konzentrationen der MASTAZYME™ BORRELIA IgG- / IgM-Kalibratoren werden in Einheiten (U/mL) angegeben. Die exakten Konzentrationen sind auf den Etiketten der Kalibratoren angegeben. Die Extinktion wird entweder graphisch oder mittels Computersimulation gegen die Konzentration der Kalibratoren aufgetragen und die Konzentration der Patientenprobe direkt abgelesen oder berechnet.

Die quantitative Bestimmung der Antikörper gegen Borrelia burgdorferi ermöglicht eine einfache zuverlässige Überwachung der entsprechenden Antikörpertiter zur Diagnose und Therapiekontrolle.

10. Testcharakteristika

Die Testcharakteristika der MASTAZYME™ BORRELIA IgG / IgM ELISAs wurden entsprechend den Vorgaben der IVD-Direktive der EU erstellt und bewegen sich im erwarteten Bereich. Auf Wunsch können diese Daten dem Anwender zur Verfügung gestellt werden.

11. Literatur

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, J Clin Microbiol, 30: 370-376, (1992).
2. Putzker M, Sauer H: Labordiagnostik von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Klin. Lab., 41: 431-439(1995).
3. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 263: 412-419 (1986).
4. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 167: 392-400 (1993).
5. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 16: 208-214 (1993).
6. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiol Rev, 50:381-400 (1986).
7. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol, 42: 378-383 (1992).
8. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgG antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 158: 754-760 (1988).
9. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 182: 255-270 (1994).
10. Blenk H: Serodiagnostik der Lyme-Borreliose, mta, 8(6): 575-580 (1993).
11. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, Zbl Bakt Hyg A, 263: 92-102 (1986).
12. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 321: 586-597 (1989).
13. Grodzicki RL, Steere AC: Comparison of Immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease, J Infect Dis, 157: 790-797 (1988).
14. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections, J Infect Dis, 156: 183-186 (1987).
15. Fingerle V, Hauser U, Liegl G, PetkoB, Preac-Mursic V,Wilske B: Ospa- und OspC- Expression von *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*, Abstract in Fortschritte in der Hygiene und Mikrobiologie, 1994, Pechstein Verlag , Dobersdorf, S.202 und Posterbeitrag auf dem 46. DGHM-Kongress vom 26-29-9-1994 in Kiel

| Contents | Page |
|--|-------------|
| 1. Intended use | 11 |
| 2. Principle of the Test | 11 |
| 3. Kit Contents | 11 |
| 4. Materials Required but not Provided | 12 |
| 5. Warnings and Precautions | 12 |
| 6. Storage and Stability | 13 |
| 7. Specimen Collection and Handling | 13 |
| 8. Assay Procedure | 13 |
| 9. Results and Interpretation | 14 |
| 10. Assay Performance | 15 |
| 11. References | 16 |

1. Intended Use

MASTAZYME™ BORRELIA (*Borrelia burgdorferi*) Antibody ELISA has been designed for the detection and the quantification of specific IgG / IgM antibodies respectively against *Borrelia burgdorferi* in serum and plasma. Further applications in other body fluids are possible and can be provided on request.

This assay is intended for *in vitro* diagnostic use only.

All laboratory test results should be interpreted in conjunction with other clinical data. The clinical judgement and further tests have to be taken into account additionally.

2. Principle of the Test

The ELISA test can be described in four stages:

2.1 Serum incubation

Specific antibodies bind to antigen on the solid phase to form a stable immune complex. After incubation for 30 minutes at room temperature the wells are washed with a prediluted wash buffer to remove all non-reactive serum components.

2.2 Conjugate incubation

The anti-human-IgG / IgM horseradish peroxidase conjugate is added to all wells. The conjugate binds to IgG / IgM antibodies on the solid phase antigen to form a stable sandwich. After incubating for 30 minutes at room temperature the excess conjugate is removed by washing all wells with wash buffer.

2.3 Substrate reaction and stopping

The TMB substrate is dispensed into each well and the peroxidase enzyme/substrate reaction forms a stable blue chromogen. The reaction and consequent colour development is stopped after a 15 minutes incubation at room temperature by adding 0.5 N H₂SO₄ to the wells. The shift in pH also causes the chromogen to change colour from blue to yellow.

2.4 Reading and interpretation

The colour intensity is read in a microtiter plate reader at 450 nm (recommended reference wavelength for bichromatic measurement: 600–690 nm). The intensity of the colour (OD) is directly proportional to the concentration of the specific antibody in the patient sample.

The results can be read from a calibration curve or with an electronic graphing package using a 4 parameter sigmoidal curve.

3. Kit Contents

The kits contains sufficient reagents for 12 x 8 = 96 determinations. Kit components should be stored at 2–8 °C. The expiry date is shown on the individual labels.

| | | |
|------------|-------------------|--|
| 12 | Microtiter strips | Single strips each with 8 break-apart wells coated with the antigen of <i>B. burgdorferi s. s.</i> , <i>B. afzelii</i> and <i>B. garinii</i> . |
| 1 x | Frame holder | |
| 4 x 1.5 mL | Calibrators 1–4 | Stabilized human plasma containing antibodies against the above antigens and pre-diluted in buffer. Ready to use (RTU). |

| | Anti-Borrelia IgG concentration [U/mL] | Anti-Borrelia IgM concentration [U/mL] |
|------------------------|---|---|
| Calibrator 1 | 1 | 1 |
| Calibrator 2 (Cut-off) | 100 | 100 |
| Calibrator 3 | 200 | 200 |
| Calibrator 4 | 1600 | 800 |
| Positive Control | 400 | 400 |
| Negative Control | 50 | 50 |

| | | |
|------------|----------------------------------|---|
| 1 x 1.5 mL | Negative Control | Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve. |
| 1 x 1.5 mL | Positive Control | Stabilized human plasma, RTU, can be integrated into the calibration curve. |
| 2 x 60 mL | Sample diluent | PBS solution with preservative, ready to use. |
| 1 x 12 mL | Enzyme conjugate solution | HRP-labelled goat anti-human-IgG / IgM, ready to use. |
| 1 x 12 mL | TMB substrate | 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine, ready to use. |
| 1 x 12 mL | Stopping solution | 0.5 N sulfuric acid, ready to use. |
| 2 x 50 mL | Wash buffer 10 x concentrated | PBS/Tween buffer solution 10x concentrated. To be diluted 1:10 prior to use; the concentrate should be warmed up to 37 °C for 15 min to dissolve any crystals |

4. Materials Required but not Provided

- 5 µL-, 100 µL- and 500 µL micropipettes and a multichannel pipette (optional).
- Microtiter plate reader with a 450 nm filter (reference filter 600–690 nm)
- Microtiter plate washer (if washing manually: wash bottle)
- Reagent tubes for serum dilution
- Measuring cylinder
- Distilled water or water of similar or better quality

5. Warning and Precautions

- For *in vitro* diagnostic use only! Do not ingest! Laboratory safety precautions should be followed. Do not eat, drink or smoke in the laboratory.
- All sera, plasma and buffers containing human biological material were found to be negative for Hepatitis B, C and HIV. Nevertheless, precautions such as the use of latex gloves have to be taken.
- Serum and reagent spills should be cleaned with a disinfecting solution (e.g. sodium hypochlorite 5 %) and the refuse disposed of appropriately.
- All reagents should be brought to room temperature (18 to 24 °C) before starting the test procedure.
- Before pipetting, all reagents should be mixed thoroughly by gentle agitation. Vigorous shaking leading to formation of foam should be avoided.

- It is important to pipette with constant time intervals, so that all the wells of the microtiter plate have the same reaction conditions.
- When pipetting reagents out of the bottles care has to be taken that the stoppers are not contaminated. Furthermore, disposable pipette tips are strongly recommended to avoid cross-contamination. The contents of the bottles are usually sensitive to oxidation so should be opened only for a short time.
- No reagents from different kit batches should be used and reagents should not be mixed with one another.
- All reagents should be used within the listed shelf life.
- In accordance with Good Laboratory Practice (GLP) or following ISO 9001 all laboratory equipment should be checked regularly regarding accuracy and precision. This refers e.g. to microliter pipets and washing or measurement (ELISA Reader) instrumentation.
- Certain reagents (especially the stop solution and substrate) are irritants- avoid contact with skin, eyes and mucosal membranes. In case of accident, rinse with water and seek medical attention. Clean all equipment after use to avoid secondary contact incidents.

6. Storage and Stability

Store all reagents at 2–8 °C.

The expiry date of each reagent is printed on the individual labels. Do not use any reagents after the expiry date has been exceeded.

The diluted wash buffer is stable for up to 4 weeks when stored at 2–8 °C. However ensure that this is at room temperature before testing.

Kits should be used within three months of opening.

7. Specimen Collection and Handling

Both serum and plasma (EDTA, heparin) can be used for testing. Samples can be stored at 2–8 °C for up to 3 days, although for longer storage periods they should be aliquoted and kept at -20 °C. Repeated freezing and thawing is contra-indicated. Lipaemic, haemolytic, icteric and bacterially contaminated samples can cause false positive or false negative results.

Patient sera should be prediluted 1:101 in sample diluent (e.g. 5 µL serum + 500 µL sample diluent) prior to testing.

In case of interference with rheumatic factors, serum preabsorption with RF absorbent (MASTSORB™ Order Code: 651003) is recommended. **Do not absorb the calibrators.**

8. Assay Procedure

8.1. Preparation of Reagents

Allow all kit components and specimens to reach room temperature (RT, 18–24 °C) prior to use and mix well.

Washing buffer: Dissolve any crystals which may be in the bottle by warming to 37 °C and then mix well.

Dilute the concentrated washing buffer 1:10 with distilled water (e.g. 50 mL buffer concentrate + 450 mL distilled water). Mix thoroughly.

- Strictly follow the instructions for reliable test performance. The user takes sole responsibility for any modifications to the test procedure.
- All reagents and samples must be brought to room temperature before use, but should not be left at this temperature for longer than necessary.

- A standard calibration curve should be established with each assay.
- Replace any unused microtiter strips in the resealable aluminium bag provided and store under dry conditions at 2–8 °C.

8.2. Assay Steps

Prepare a sufficient amount of microtiter wells for the calibrators, controls and samples.

Note: Other incubation conditions are possible. However in case of modifications to the recommended test procedure (e.g. an incubation temperature of 37 °C instead of RT) assay performance should be validated by the user.

1. Pipette 100 µL each of the diluted (1:101) samples and the ready to use calibrators and controls into the appropriate wells.
2. Incubate the test plate at room temperature for 30 minutes.
3. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
4. Pipette 100 µL of enzyme conjugate solution into each well.
5. Incubate the test plate for 30 minutes at room temperature.
6. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with 300 µL of diluted wash buffer. Afterwards remove residual wash buffer by gentle tapping of the microtiter plate onto a paper towel.
7. Pipette 100 µL of TMB substrate into each well.
8. Incubate for 15 minutes in the dark (e.g. drawer) at room temperature.
9. Add 100 µL of stopping solution to each well.
10. After thorough mixing and wiping the bottom of the plate, read the optical density at 450 nm and calculate the results. Blank against air. A bichromatic measurement using a reference wavelength of 600–690 nm is recommended. Concentrations can be plotted with an electronic graphing package or by hand against the calibration curve.

The developed colour is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

9. Results and Interpretation

Example for IgG calibrator curve (U/mL)

| | U/mL | OD 450 nm |
|------------------|------|-----------|
| Cal. 1 | 1 | 0.006 |
| Cal. 2 (Cut-off) | 100 | 0.520 |
| Cal. 3 | 200 | 0.838 |
| Cal. 4 | 1600 | 2.009 |
| Positive Control | 400 | 1.328 |
| Negative Control | 50 | 0.356 |

The table above should be considered as an example which was achieved under arbitrary temperature and environmental conditions. **These data do NOT describe reference values which have to be found in other laboratories in the same way!**

9.1 Qualitative

The calculated OD values for patient sera as mentioned above are compared with the value for the cut-off calibrator. If the value of the sample is higher, then it should be read as positive.

A value below the cut-off calibrator should be read as negative. It seems reasonable to define a range of $\pm 10\%$ around the OD value of the cut-off as a grey zone. It is recommended to repeat results laying within the grey zone using the same serum or a new sample of the same patient, taken after 2–4 weeks. Both samples should be measured in parallel in the same run.

9.2 Quantitative

The ready to use calibrators of the MASTAZYME™ BORRELIA antibody kit are defined and values expressed are in arbitrary units (U/mL). This gives access to an exact and reproducible quantification and in consequence patient antibody titer monitoring is possible. Concentration values for calibrators are printed on the labels of the vials.

A standard curve is plotted by entering the mean absorbance value of the calibrators on the Y-axis and the corresponding concentration on the X-axis using graph paper. The concentration of the patient samples can then be read directly from the graph.

The calculation of the result can be performed using a computer and a suitable software program.

10. Assay Performance

The assay characteristics of the MASTAZYME™ BORRELIA IgG / IgM ELISA have been established and assessed according the European IVD directive. Detailed validation data can be provided on special request.

11. References

1. Ma B, Christen B, Leung D, Vigo-Pelfrey C: Serodiagnosis of Lyme borreliosis by immunoblot: Reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*, J Clin Microbiol, 30: 370-376, (1992).
2. Putzker M, Sauer H: Labordiagnostik von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Klin. Lab., 41: 431-439(1995).
3. Münchhoff P, Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bavarian forest workers, Zbl Bakt Hyg A, 263: 412-419 (1986).
4. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC: Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease, J Infect Dis, 167: 392-400 (1993).
5. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 16: 208-214 (1993).
6. Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiol Rev, 50:381-400 (1986).
7. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PAD: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp.nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis, Int J Syst Bacteriol, 42: 378-383 (1992).
8. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC: Serodiagnosis of early Lyme disease: Analyses of IgM and IgG antibody responses by using an antibody capture enzyme immunoassay, J Infect Dis, 158: 754-760 (1988).
9. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Pfister H.-W., Preac-Mursic V., Soutschek E., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis, Med Microbiol Immunol, 182: 255-270 (1994).
10. Blenk H: Serodiagnostik der Lyme-Borreliose, mta, 8(6): 575-580 (1993).
11. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV: Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains, Zbl Bakt Hyg A, 263: 92-102 (1986).
12. Steere AC: Lyme Disease, New Engl J Med; 321: 586-597 (1989).
13. Grodzicki RL, Steere AC: Comparison of Immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease, J Infect Dis, 157: 790-797 (1988).
14. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC: Cross-reactivity in serological tests for Lyme Disease and other spirochetal infections, J Infect Dis, 156: 183-186 (1987).
15. Fingerle V, Hauser U, Liegl G, PetkoB, Preac-Mursic V,Wilske B: Ospa- und OspC- Expression von *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*, Abstract in Fortschritte in der Hygiene und Mikrobiologie, 1994, Pechstein Verlag , Dobersdorf, S.202 und Posterbeitrag auf dem 46. DGHM-Kongress vom 26-29-9-1994 in Kiel

Notizen / Notes / Note:

Notizen / Notes / Note:

Notizen / Notes / Note:

United Kingdom

Mast Group Ltd.
MAST House Derby Road,
Bootle, Mersey Side L20 1EA

Tel.: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
sales@mastgrp.com

 **Deutschland**

Mast Diagnostica GmbH
Feldstraße 20
DÉ 23858 Reinfeld

Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
mast@mast-diagnostica.de

France

Mast Diagnostic
115, Rue Jules Barni
CS 91106
80011 AMIENS CEDEX 1

Tel.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
info@mast-diagnostic.fr

www.mastgrp.com