

MASTAFLUOR™ Borrelia

Immunfluoreszenztest zum Nachweis von IgG-/ IgM-Antikörpern gegen
Borrelien burgdorferi in humanem Serum und Plasma

Immunofluorescence assay for the detection of IgG / IgM antibodies to
Borrelia burgdorferi in human serum and plasma

Test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps IgG / IgM
anti Borrelia burgdorferi dans le sérum et le plasma humain

Gebrauchsinformation / Instructions for Use / Notice Technique



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



Deutsch: Seiten 02–04



English: Pages 05–07



Français: Pages 08–10

| | | |
|--------------------------|------------|--------------|
| MASTAFLUOR™ Borrelia IgG | REF 636336 | 10 x 5 Tests |
| MASTAFLUOR™ Borrelia IgM | REF 636339 | 10 x 5 Tests |

Hersteller / Manufactured by:
Fabriqué par:

MAST DIAGNOSTICA
Laboratoriumspräparate GmbH
Feldstraße 20, D-23858 Reinfeld
Deutschland
Tel.: +49 4533 2007-0
Fax: +49 4533 2007-68
www.mastgrp.com
mast@mast-diagnostica.de

Distributed by:

MAST GROUP Ltd.
MAST House, Derby Road, Bootle
UK-Mersey Side L20 1EA
Great Britain
Phone: +44 151 933 7277
Fax: +44 151 944 1332
www.mastgrp.com
sales@mastgrp.com

Distribué par:

MAST DIAGNOSTIC
115, Rue Jules Barni
80000 Amiens
France
Tél.: + 33 3 22 80 80 67
Fax: + 33 3 22 80 99 22
www.mastgrp.com
service-commercial@mast-diagnostic.fr

MASTAFLUOR™ Borrelia – 2009-12-16

Einführung

Borrelia burgdorferi zählt zu der Familie der Spirochaeten, wobei drei Arten als humanpathogen deklariert werden: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* und *B. garinii*. Endemiegebiete liegen in Zentral- und Osteuropa sowie Russland, China und Japan. Die Krankheit wird durch Zeckenbisse und zwar in Europa vor allem durch *Ixodes ricinus* übertragen. In den Endemiegebieten wie Süddeutschland und Österreich sind bis zu 50 % der Zecken infiziert.

Im klinischen Verlauf zeigt sich nach einem im ersten Stadium auftretenden Erythema migrans z. B. eine Neuroborreliose. Es wurden aber auch chronische Arthritis, Enzephalitis, Meningitis, Myositis und Hepatitis beobachtet. Die Behandlung erfolgt mit verschiedenen Antibiotika oral, wie z. B. Doxycyclin, Amoxycillin, Cefuroxim oder Penicillin G. Eine spezifische Impfung ist möglich, dabei erfolgt die Immunprophylaxe entweder mit einem rekombinanten OspA Präparat oder einem rekombinanten polyvalenten OspC Impfstoff.

Die Labordiagnostik erfolgt über den Nachweis von Antikörpern in Blut und Liquor. Als Methoden werden ELISA, Immunfluoreszenz, Hämagglutination oder Western-Blot eingesetzt. Neben Ganzzellextrakten wurden in letzter Zeit zunehmend aufgereinigte oder rekombinante Einzelproteine als Antigene eingesetzt. Hierbei muss allerdings in der Regel auf Sensitivität verzichtet werden. Es hat sich gezeigt, dass zwischen den verschiedenen Test-Methoden erhebliche Unterschiede in der Interpretation auftreten, sodass ein sicheres Verfahren in der Beobachtung des Titerverlaufs besteht. Der Western-Blot dient als Bestätigungstest, da elektrophoretisch aufgetrennte Einzelantigene in ihrer Reaktion mit spezifischen Serumantikörpern ausgewertet werden können.

Liegt lediglich ein positives IgG-Ergebnis (IgM negativ) vor, kann man von einer Immunität des Probanden ausgehen. Wie oben erwähnt, sollte allerdings bei eindeutig klinischem Befund eine Überprüfung des Titeranstiegs mit dem gleichen Assay durchgeführt werden. Bei gleichzeitig positivem IgM-Befund ergibt sich ein Hinweis auf ein aktives Geschehen.

Verwendungszweck

Der MASTAFLUOR™ *Borrelia* ist ein Immunfluoreszenztest zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*.

Testprinzip

Das verdünnte Probenmaterial (Serum, Plasma) wird zusammen mit den erforderlichen Kontrollen auf die Testfelder des Objektträgers pipettiert. Die Testfelder sind mit gereinigtem Antigen beschichtet. Sofern spezifische Antikörper im Probenmaterial sind, binden diese an entsprechende Antigenstrukturen auf den Testfeldern und bilden mit diesen einen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex. Unspezifisch oder nicht gebundene Antikörper werden in einem Waschschrift entfernt. An die spezifischen Komplexe binden dann in einer Konjugatreaktion FITC-gekoppelte Anti-human-IgG- bzw. FITC-gekoppelte Anti-human-IgM-Antikörper. Anschließend werden unspezifisch oder nicht gebundene Reaktionskomponenten durch einen Waschschrift entfernt. Im Fluoreszenzmikroskop werden die Testfelder ausgewertet.

Packungsinhalt

| Inhalt | 50 Tests | Spezifikation |
|-------------------------|--------------|--|
| Objektträger | 10 x 5 Wells | Beschichtet mit gereinigtem <i>Borrelia burgdorferi</i> |
| Positives Kontrollserum | 0,5 mL | IgG- oder IgM-positives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃ |
| Negatives Kontrollserum | 0,5 mL | IgG- und IgM-negatives Serum, gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃ |
| FITC-Konjugat | 2 mL | FITC-markiertes Anti-human-IgG (γ -Kette) oder FITC-markiertes Anti-human-IgM (μ -Kette); gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃ |
| Serumdiluent | 1 x 10 mL | Probenverdünnungspuffer, 5-fach konz., enthält < 0,1 % NaN ₃ |
| Eindeckmedium | 3 mL | gebrauchsfertig, enthält < 0,1 % NaN ₃ |
| PBS | 2 Sachets | Je 1 Sachet in 1 L destilliertem Wasser lösen, pH 7,2 \pm 0,2 |

Zusätzlich benötigte Materialien

1. Sterile Reaktionsgefäße
2. Mikropipetten und dazu passende Spitzen
3. Küvetten
4. Feuchte Kammer
5. Messkolben oder Messbecher
6. Destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität
7. Pinzette
8. Deckgläser
9. (Wasch-) Pufferflasche
10. Fluoreszenzmikroskop mit einem 490 nm Anregungsfilter (Blauanregung) und 510 nm Sperrfilter und Farbteiler.

Haltbarkeit und Lagerung

Der MASTAFLUOR™ *Borrelia* ist bis zu dem auf dem Etikett vermerkten Haltbarkeitsdatum verwendbar, sofern er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Der PBS-Puffer ist nach dem Auflösen 30 Tage stabil, wenn er bei 2–8 °C aufbewahrt wird.

Serum- und Plasmaproben können 3 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten sie bei -20 °C eingefroren werden. Allerdings sollten wiederholte Einfrier- / Auftauzyklen vermieden werden.

Warnhinweise

1. Das Kit dient nur zur *in-vitro* Diagnostik.
2. Vor der Testdurchführung sorgfältig die Gebrauchsinformation lesen. Die Testdurchführung nicht ohne Validierung modifizieren.
3. Keine Reagenzien nach dem Verfallsdatum verwenden.
4. Die allgemeinen Arbeitsschutzrichtlinien für das Arbeiten mit potentiell infektiösen Materialien einhalten. Es wird empfohlen, entsprechende Schutzkleidung zu tragen. Den Test immer in geeigneten Laborräumen abarbeiten.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Wenn möglich, sollten Einmalpipettenspitzen und Einmalreaktionsgefäße verwendet werden. Es dürfen nur gereinigte Laborgläser verwendet werden, die nach dem Spülen mit demineralisiertem oder destilliertem Wasser abgespült wurden.
7. Die im Kit enthaltenen Kontrollen sind Humanseren, die auf Antikörper gegen das HI-Virus und HBsAg getestet wurden und für negativ befundet wurden. Dennoch sollten alle menschlichen Seren als potentiell infektiös angesehen werden, weil Infektionen nicht mit letztendlicher Sicherheit ausgeschlossen werden können.
8. Nur Wasser von hoher Qualität verwenden (destilliertes Wasser oder Wasser höherer Qualität).
9. Keine Reagenzien unterschiedlicher Chargen mischen.
10. Eine Kontamination der Reagenzien vermeiden; die Flaschen immer wieder mit den richtigen Deckeln verschließen. Zum Pipettieren immer eine neue Pipettenspitze für jeden Arbeitsschritt verwenden.
11. Ein Austrocknen der Wells verhindern.
12. Die Objektträger nicht direktem Sonnenlicht oder anderen vergleichbar extremen Bedingungen aussetzen.
13. Probenmaterialien und Einmalartikel, die mit dem Probenmaterial in Kontakt gekommen sind, entsprechend gängiger Vorschriften zur Entsorgung potentiell infektiösen Materials vernichten. Arbeitsflächen mit einem geeigneten Flächendesinfektionsmittel gemäß der Anwendungsvorschrift dekontaminieren. Glasgefäße o. ä. können bei 121 °C autoklaviert werden.
14. FITC-Konjugate sollen nicht dem Sonnen-, UV- oder Fluoreszenzlicht ausgesetzt werden. Sofern die Konjugate nicht benötigt werden, diese lichtgeschützt aufbewahren.
15. Seren, die erkenntlich mikrobiologisch kontaminiert sind, nicht verwenden.
16. Hämolytische oder lipämische Seren können bei 56 °C inaktiviert werden.
17. Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Beide Reagenzien reagieren bei Inkorporation toxisch. Natriumazid kann mit Metallen (Blei, Kupfer) explosive Metallazidverbindungen bilden. Bei der Entsorgung von Azidreagenzien über den Laborabfluss ist daher mit viel Wasser nachspülen.

Testdurchführung

1. Vor dem Testansatz alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen (mindestens 20 °C).
2. 1 Sachtet PBS-Puffer mit 1 L destilliertem Wasser oder Wasser höherer Qualität lösen.
3. Serumdiluent 1:5 (20 mL Diluent + 80 mL destilliertes Wasser) verdünnen.
4. Verdünnung der Patientenserum mit Serumdiluent
IgG-Ansatz:
1:160 z. B. 5 µL Serum + 795 µL Serumdiluent
IgM-Ansatz:
1:40 z. B. 5 µL Serum + 195 µL Serumdiluent
Für die IgM-Bestimmung wird eine Präabsorption mit MASTSORB (Kat.-Nr.: 651003) empfohlen, um z.B. eine Störung durch Rheumafaktoren zu minimieren.
Kontrollen dürfen nicht absorbiert werden.
5. Die Kit-Kontrollen sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden.
6. Den eingeschweißten Objektträger an der Einkerbung aufreißen und vorsichtig aus der Alutüte herausnehmen.
7. Je 20–25 µL der Kontrollen oder der verdünnten Patientenproben auf ein Testfeld pipettieren. Die Probe soll das ganze Testfeld bedecken. Mit der Pipettenspitze dabei nicht über das Testfeld kratzen.
8. Die Objektträger in eine feuchte Kammer legen. IgG-Ansätze 30 min / IgM-Ansätze 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Nach der Inkubation die Objektträger vorsichtig aus der feuchten Kammer nehmen und mit PBS aus einer Spritzflasche vorsichtig auf die Mitte des Objektträgers zielen, um die Seren von den Testfeldern abzuspülen. Dabei nie direkt mit dem Spritzstrahl auf die Testfelder zielen.
10. Die Objektträger in einer Küvette mit PBS-Puffer 15 min bei Raumtemperatur waschen. Ein Wechseln des Puffers nach 5 min erhöht die Waschstringenz.
11. Die Objektträger aus dem Puffer nehmen und den Puffer kurz von der Maske abklopfen, indem man mit der Längsseite des Objektträgers auf eine saugfähige Unterlage klopft. Nie mit einem Papiertuch o. ä. über die Testfelder wischen!
12. Die Objektträger sofort in die feuchte Kammer legen und einen Tropfen des entsprechenden FITC-Konjugats (20–25 µL) auf jedes Testfeld tropfen. Das Konjugat soll das ganze Testfeld bedecken. Die Testfelder dürfen nach dem Waschschrift zu keinem Zeitpunkt eintrocknen!
13. Die Objektträger in der feuchten Kammer 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren (gilt für IgG- und IgM-Ansätze).
14. Es empfiehlt sich, das Mikroskop etwa 10–15 min vor Ablauf der Konjugatinkubation anzuschalten, damit die Lampe einbrennen kann. Bitte stets die Betriebsanleitung des Mikroskops beachten.
15. Nach der Konjugatinkubation die Objektträger wie unter den Pkt. 10 und 11 beschrieben waschen.
16. Einen kleinen Tropfen Eindeckmedium auf jedes Testfeld tropfen und mit einem Deckglas den Objektträger eindecken.

Hinweis: Wird zuviel Eindeckmedium auf die Testfelder getropft, so kann das Deckglas beim Mikroskopieren leicht verrutschen. Zudem kann überschüssiges Eindeckmedium zu einer Lichtstreuung führen, was eine hohe Hintergrundfluoreszenz zur Folge hat. Überschüssiges Eindeckmedium kann mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden, indem man dieses an die Längsseite des Objektträgers hält.

17. Die Reaktionen können nun mit einem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Es empfiehlt sich dabei eine 400- bis 800-fache Vergrößerung.

Interpretation der Reaktionen

Validierung des Tests

Die Kontrollen müssen folgende Reaktionen zeigen:

| Probe | Fluoreszenzintensität |
|------------------------|-----------------------|
| Positive Kontrolle IgG | 3 + bis 4 + |
| Positive Kontrolle IgM | 2 + bis 3 + |
| Negative Kontrolle | negativ |

Zur korrekten Beurteilung der Patientenproben sollte immer die positive und negative Kontrolle mit herangezogen werden.

Interpretation der Patientenreaktionen

IgG-positive Proben zeigen eine spezifisch gleichmäßig grüne Fluoreszenz aller aktiven Borrelien auf dem Testfeld. Im Testfeld sind eventuell einige wenige Borrelien mit schwacher oder mattgrüner Anfärbung zu sehen, diese sind nicht zu berücksichtigen.

IgG-negative Proben zeigen keine oder nur eine schwache Fluoreszenz (meist am Rand des Testfeldes).

IgM-positive Proben zeigen eine spezifisch gleichmäßig grüne Fluoreszenz aller aktiven Borrelien auf dem Testfeld. Im Testfeld sind eventuell einige wenige Borrelien mit schwacher oder mattgrüner Anfärbung zu sehen, diese sind nicht zu berücksichtigen.

IgM-negative Proben zeigen keine Fluoreszenz.

Proben, die in der Verdünnung des Suchtiters zu grenzwertigen Ergebnissen führen, sollten mit einer neuen Probe erneut getestet werden. Eine Verlaufskontrolle liefert zudem Hinweise, die auf eine unspezifische Reaktion schließen lassen können.

IgG-AK \geq 1:160 und IgM-AK \geq 1:40

Zurückliegende Infektion wahrscheinlich, Reinfektion oder beginnende Infektion möglich.

IgG-AK \geq 1:320 und IgM-AK \geq 1:80

Frische oder vor kurzem erfolgte Infektion wahrscheinlich, oder Reaktivierung.

Grenzen des Nachweisverfahrens / Kreuzreaktionen

1. Aufgrund der Antigenverwandtschaft von Borrelien und anderen Spirochaeten, insbesondere *T. pallidum*, kann es zwischen beiden Erregern zu Kreuzreaktionen kommen. Bei positiven und grenzwertigen Ergebnissen ist es daher ratsam, durch geeignete Test- / Untersuchungsverfahren, eine Infektion mit o. g. Erregern auszuschließen.
2. Eine vorherige Absorption mit Reiterspirochaeten-Absorbent kann mögliche Kreuzreaktivitäten vermeiden.
3. Bei Vorabsorption der Proben können niedrige Borrelien-Antikörpertiter nicht erfasst werden.
4. Der MASTFLUOR™ Borrelia ist hoch-sensitiv und hoch-spezifisch. Dennoch sollte dieser Test, wie auch jeder andere Labortest, nicht allein zur Festlegung der Diagnose verwendet werden, sondern immer in Verbindung mit anderen Testverfahren, der Anamnese und dem klinischen Bild des Patienten.

Leistungsdaten

Die Tabellenangaben beziehen sich auf Testergebnisse, die mit Vergleichsmethoden ermittelt wurden:

| | IgG | IgM |
|--------------|---------|--------|
| Sensitivität | 95,2 % | 57,1 % |
| Spezifität | 98,75 % | 97,8 % |

Die Inter- und Intra-Assay Varianz zeigt bei diesem Test keine Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der Kontrollen.

Literatur

1. Putzker M, Sauer H: Labordiagnostik von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Klin. Lab.*, 41: 431-439(1995).
2. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, *J of Clin Immunoassay*, 16: 208-214 (1993).
3. Blenk H: Serodiagnostik der Lyme-Borreliose, *mta*, 8(6): 575-580 (1993).
4. 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).
5. Thomas L: Labor und Diagnose, 5.Auflage (1998) TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt

Introduction

Borrelia burgdorferi belongs to the family of spirochetes of which three types have been identified to be human pathogenic: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*. The endemic areas of *Borrelia* are in Central and Eastern Europe as well as Russia, China and Japan. The illness is transferred via tick bites, in Europe mainly by *Ixodes ricinus*. In the endemic zones, like Southern Germany and Austria, up to 50 % of the ticks are infected.

In the clinical course after an erythema migrans, e.g. with neuroborreliosis which appears at the first stage, also chronic arthritis, encephalitis, meningitis, myositis and hepatitis are observed. Treatment is done via different antibiotics, e.g. doxycyclin, amoxicillin, cefuroxim and penicillin G. A specific immunization is possible with immunoprophylaxis either by a recombinant OspA or by a recombinant polyvalent OspC vaccine.

The laboratory diagnosis is performed by the detection of antibodies in blood and cerebrospinal fluid. Methods employed are: ELISA, immunofluorescence, hemagglutination or Western blot. It could be shown that between the various test methods there appear significant differences in the interpretation so that the most reliable method seems to be the follow-up of the titre development. Western blot serves as a confirmatory test because electrophoretically separated single antigens can be evaluated in their reaction with specific serum antibodies.

If the test shows only a positive IgG result (IgM negative) the immunity of the patient can be concluded. In case of a clearly positive clinical finding, confirmation of the titre increase should be performed with the same assay. There is a strong suspicion of an active disease with a simultaneous positive IgM.

Intended Use

MASTAFLUOR™ *Borrelia* provide an indirect immunofluorescence test system for the detection of specific antibodies to *Borrelia burgdorferi*.

Test Principle

IFA slides are coated with purified antigen. Diluted patient serum or plasma is incubated on the wells of the slide. In the presence of specific antibodies a stable antigen-antibody complex is formed. Unspecific or unbound antibodies are removed in a washing step. Specific immune complexes are then detected by either a FITC-conjugated anti-human IgG or IgM antibody. Again unspecific or non-bound antibodies are removed in a washing step. Results could be read visually using an immunofluorescence microscope.

Kit Contents

| Content | 50 Tests | Specifications |
|------------------|--------------|---|
| Slides | 10 x 5 Wells | Coated with purified <i>Borrelia burgdorferi</i> |
| Positive control | 0.5 mL | IgG or IgM positive serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃ |
| Negative control | 0.5 mL | IgG and IgM negative serum, ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃ |
| FITC-conjugate | 2 mL | Anti-human IgG (γ-chain) FITC-conjugate or anti-human IgM (μ-chain) FITC-conjugate; ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃ |
| Serum diluent | 1 x 10 mL | Serum diluent, 5 x conc., contains < 0.1 % NaN ₃ |
| Mounting medium | 3 mL | Ready to use, contains < 0.1 % NaN ₃ |
| PBS | 2 Sachets | 1 sachet to be diluted in 1 L of distilled water, pH 7.2 ± 0.2 |

Materials Required but not Provided

1. Sterile test tubes
2. Micropipettes and tips
3. Staining dish or Coplin jar
4. Moist chamber
5. Volumetric flask for PBS
6. Distilled water or water of higher quality
7. Forceps
8. Transmitted or epi-fluorescent microscope with a 490 nm excitation filter and a 510 nm barrier filter
9. Cover slips
10. Wash bottle

Stability and Storage

MASTAFLUOR™ *Borrelia* is stable until end of shelf life as indicated on kit label. The kit should be stored at 2–8 °C.

Reconstituted PBS powder should be stored at 2–8 °C for up to 30 days.

Serum and plasma specimens may be stored at 2–8 °C for up to 3 days prior to use or for longer storage at -20 °C. Repeated freezing and thawing of specimens should be avoided.

Warnings and Precautions

1. The reagents supplied in this kit are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Read instructions carefully before conducting the assay. Do not modify the procedure.
3. Do not use kit beyond the expiry date.
4. Wear appropriate protective clothing and use appropriate facilities.
5. Do not mouth pipette.
6. Use disposable plasticware where ever possible. Re-usable glassware should be washed thoroughly and rinsed free of detergents before use.
7. Sera provided have been tested for antibodies to HIV and for HBsAg and found to be negative. However, they should be treated as potentially infectious materials and capable of transmitting diseases. No guarantee is given that the sera are free of infection or microbial contamination.
8. Use distilled water or water of higher quality.
9. Do not mix reagents between different lots, as reagents have been calibrated for each batch.
10. Do not cross-contaminate reagents or interchange caps on bottles. Use a separate pipette or pipette tips for each sample and reagent.
11. Do not allow wells to dry out during the assay procedure.
12. Do not expose slides to intense sunlight or similar adverse conditions while incubating.
13. Contaminated plastic ware should be disposed and incinerated. Contaminated glassware should either be autoclaved at 121 °C or decontaminated with a solution of 2.5 % sodium hypochlorite. All liquid waste should be decontaminated appropriately e.g. using sodium hypochlorite.
14. Do not expose the FITC-conjugate at any stage to strong sunlight, UV or fluorescent light. Keep in a dark place whenever possible.
15. Microbial contaminated serum samples should not be used.
16. In the event that haemolysed or lipemic serum must be used, heat inactive at 56 °C before use.
17. Sodium azide is used as a preservative as marked. It may be toxic if ingested. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive salts. Always dispose by flushing to drain with plenty of water.

Test Procedure

1. Allow all materials to reach room temperature (at least 20 °C) prior to use.
2. Reconstitute one sachet of PBS powder with 1 litre of distilled water or water of higher quality.
3. Dilute concentrated serum diluent 1:5 with distilled water e.g. 20 mL diluent + 80 mL distilled water.
Dilution of patient samples:
For IgG antibodies:
1:160 with serum diluent
e.g. 5 µL serum + 795 µL serum diluent
For IgM antibodies:
1:40 with serum diluent
e.g. 5 µL serum + 195 µL serum diluent
For IgM determination a preabsorption with Rf absorbent (MASTSORB™ Order Code: 651003) is recommended to reduce interferences e.g. with rheumatic factors. **Do not absorb the controls.**
4. Controls are supplied ready to use and must not be diluted.
5. Carefully remove the required number of slides from their sachets and mark accordingly. Hold the slide at the edge and do not touch the wells. Place the slides in a moist chamber.
6. Apply 20–25 µL of diluted specimens and ready to use controls to respective wells on the slides according to a prepared work format. Ensure that all the wells are covered and that serum does not escape from the wells.
Direct contact of a pipette tip with the slide surface may result in damage to the antigen substrate and should be avoided.
7. Cover the moist chamber and incubate as follows:
IgG assay: room temperature for 30 min.
IgM assay: room temperature for 45 min.
8. After incubation wash slides carefully with PBS from a wash bottle, taking care not to direct the jet onto the test wells. This may be done by directing the jet of PBS along the centre of the slide, tilting the slide first towards wells 1–5 and then towards 6–10.
9. Immerse the slides in a staining dish or Coplin jar containing PBS and wash for 15 min with a change of PBS after 5 min.
10. Remove slides one at a time from the staining jar and drain off any excess PBS. Using a blotter, dry the area outside wells. Wipe off any excess PBS from the back of the slide. Do not touch the well surface.
11. Immediately transfer the slide to a moist chamber and add 20–25 µL of FITC-conjugate (either IgG or IgM) to each well. Ensure that all the wells are covered by the conjugate.
12. Incubate slides at room temperature in a covered moist chamber in the dark for 30 minutes (same incubation for IgG and IgM).
13. Switch on microscope 15 minutes prior to use.
14. After incubation wash the slides with PBS as in steps 9 and 10.

15. Apply one small drop of Mounting Medium to each well on a slide. Place a cover slip on the slide and read the results immediately. Take care not to trap air pockets under the cover slip. Excess Mounting Medium on a slide may result in high background fluorescence due to light scattering. Remove excess Mounting Medium with a paper towel avoiding any direct movement of the cover slip.
16. Examine under a fluorescence microscope at a total magnification of 400x to 800x.

Interpretation of Results

Test Validation

Examine the control samples before reading patient samples. The controls must give the following patterns to be valid.

Specimen sera are assessed by way of comparison with the controls included in the test.

| Sample | Fluorescence Intensity |
|----------------------|------------------------|
| Positive control IgG | 3 + to 4 + |
| Positive control IgM | 2 + to 3 + |
| Negative control | negative |

Interpretation of Specimen Results

IgG positive specimen should show a homogenous green fluorescence of all active Borrelia. Less active Borrelia may also be present with a faint green colour and these should not be taken into consideration.

IgG negative specimen should show no fluorescence; a green staining without fluorescence or weak fluorescence (mainly at the edge of the test-field) may be visible.

IgM positive specimen should show a homogenous green fluorescence of all active Borrelia. Less active Borrelia may also be present with a faint green colour and these should not be taken into consideration.

IgM negative specimen should show no fluorescence; a green staining without fluorescence or weak fluorescence (mainly at the edge of the test-field) may be visible.

IgG-Ab \geq 1:160 and IgM-Ab \geq 1:40

Previous infection probable, possible reinfection or beginning infection.

IgG-Ab \geq 1:320 and IgM-Ab \geq 1:80

Acute or recent reinfection probable, reactivation possible.

Limitations / Cross-reactions

1. Cross-reactivity with spirochetes, particularly *T. pallidum* can result in false positives. In case of positive and borderline results it is recommended to exclude infections with cross reacting organism.
2. Possible cross-reactivity may be avoided by using spirochete absorbent.
3. In pre-absorbed samples detection of low Borrelia antibody titres may be not detected.
4. MASTAFLUOR™ Borrelia has been demonstrated to be highly sensitive and specific, however, results should be considered along with all serological tests, clinical history and other aspects of patient management to be considered diagnostically significant.

Performance

Data in the table were obtained by comparing MASTAFLUOR™ Borrelia results with data of other assays based on a different method (e.g. ELISA):

| | IgG | IgM |
|-------------|---------|--------|
| Sensitivity | 95.2 % | 57.1 % |
| Specificity | 98.75 % | 97.8 % |

Inter-assay and intra-assay variances are not detectable in respect to control fluorescence intensity.

References

1. Putzker M, Sauer H: Labordiagnostik von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi sensu lato*, Klin. Lab., 41: 431-439(1995).
2. Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 16: 208-214 (1993).
3. Blenk H: Serodiagnostik der Lyme-Borreliose, mta, 8(6): 575-580 (1993).
4. 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).
5. Thomas L: Labor und Diagnose, 5.Auflage (1998) TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt.

Introduction

Borrelia burgdorferi appartient à la famille des spirochètes où trois types ont été identifiés comme pathogènes chez les humains : *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* et *B. garinii*. Les zones endémiques de *Borrelia* sont l'Europe centrale et de l'est ainsi que la Russie, la Chine et le Japon. La maladie se propage par des piqûres de tiques, principalement Ixodes ricinus en Europe. Dans les zones endémiques comme le sud de l'Allemagne et l'Autriche, plus de 50 % des tiques sont infectés.

Sur le plan clinique, après l'érythème migrans et la neuroborréliose qui apparaissent en premier, arthrite chronique, encéphalite, méningite, myosite et hépatite sont aussi observées. Le traitement consiste en la prise d'antibiotiques : doxycycline, amoxicilline, céfuroxime et pénicilline G. une immunisation spécifique est possible avec immunoprophylaxie soit avec un vaccin recombinant OspA soit avec un vaccin recombinant polyvalent OspC.

Le diagnostic de laboratoire est réalisé par détection des anticorps dans le sang et le liquide cébrospinal. Les méthodes employées sont : l'ELISA, l'immunofluorescence, l'hémagglutination et le western Blot. Il peut être montré qu'entre les différentes méthodes de test il apparaît des différences significatives d'interprétation donc la méthode la plus reproductible semble être le suivi du titre en anticorps. Le Western Blot est utilisé comme test de confirmation car les antigènes séparés par électrophorèse peuvent être évalués pour leur réaction avec des anticorps spécifiques du sérum.

Si le test montre un résultat positif uniquement en IgG (IgM négatif) on peut conclure à une immunité. En cas de positivité clinique clairement définie, la confirmation de l'augmentation du titre doit être réalisée avec le même test. Il y a une forte suspicion de maladie active avec un résultat positif simultané en IgM

Domaine d'utilisation

MASTAFLUOR™ *Borrelia* est un test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps spécifiques anti-*Borrelia burgdorferi*.

Principe du test

Les lames d'immunofluorescence sont recouvertes d'antigènes purifiés.

Le sérum ou le plasma de patient est incubé dans les puits de lame. Un complexe immun est formé en présence d'anticorps spécifiques. Les anticorps non spécifiques ne formant pas de complexes sont éliminés lors d'un lavage. Les complexes immuns spécifiques sont détectés par immunofluorescence à l'aide d'un conjugué FITC d'anticorps humain IgG ou IgM. Après incubation le conjugué en excès est éliminé lors d'une étape de lavage. Les résultats sont lus sous microscope à immunofluorescence.

Composition du coffret

| Contenu | 50 Tests | Spécifications |
|-------------------|--------------|--|
| Lames | 10 x 5 Puits | Recouvertes d'antigènes <i>Borrelia. burgdorferi</i> purifiées. |
| Contrôle positif | 0,5 mL | Sérum positif de IgG ou IgM, Prêt à l'emploi, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ |
| Contrôle négatif | 0.5 mL | Sérum négatif d'IgG et d'IgM, Prêt à l'emploi, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ |
| Conjugué FITC | 2 mL | Conjugué anti-IgG humaine (chaîne γ) FITC ou anti-IgM humaine (chaîne μ) FITC Prêt à l'emploi, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ |
| Diluant du sérum | 1 x 10 mL | Diluant d'échantillon, concentré 5X, contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ |
| Milieu de montage | 3 mL | Prêt à l'emploi contient $\text{NaN}_3 < 0,1 \%$ |
| PBS | 2 Sachets | Dissoudre le contenu d'un sachet dans 1L d'eau distillée pH $7,2 \pm 0,2$ |

Matériel nécessaire mais non fourni

1. Tubes stériles.
2. Micropipettes et embouts.
3. Bac à coloration ou jarre de Coplin.
4. Chambre humide.
5. Flacon gradué pour le tampon PBS.
6. Eau distillée ou de qualité supérieure.
7. Pincettes.
8. Microscope à transmission ou épifluorescence avec un filtre d'excitation à 490 nm et un filtre barrière à 510 nm
9. Lamelles.
10. Flacon de lavage.

Conservation et stabilité

MASTAFLUOR™ *Borrelia* se conserve jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Le coffret doit être conservé à 2–8°C.

Le tampon PBS reconstitué se conserve 30 jours à 2–8°C.

Les prélèvements de sérum et de plasma se conservent à 2–8°C pendant 3 jours avant utilisation ou à -20° C au-delà. Éviter de décongeler et de recongeler les échantillons.

Précaution d'emploi

1. Les réactifs du coffret sont uniquement à usage de diagnostic *in vitro*.
2. Lire soigneusement la notice d'utilisation avant de commencer le test. Ne pas modifier la procédure.
3. Ne pas utiliser le coffret au-delà de la date de péremption indiquée sur le coffret.
4. Porter des vêtements adaptés à ce type de manipulation et utiliser un équipement de protection approprié.
5. Ne pas pipeter avec la bouche.
6. Utiliser du matériel en plastique dans la mesure du possible. La verrerie doit être lavée soigneusement et rincée sans détergent avant utilisation.
7. Les sérums fournis ont été testés et se sont avérés négatifs pour la présence d'anticorps anti-HIV et d'antigène HBs. Cependant, ils doivent être considérés comme potentiellement dangereux et infectieux.. Il est recommandé d'être extrêmement vigilant lors de la manipulation d'échantillon d'origine humaine.
8. Utiliser de l'eau distillée ou de qualité supérieure.
9. Ne pas échanger les réactifs de différents lots car les réactifs sont calibrés pour chaque lot.
10. Ne pas intervertir les réactifs ou les bouchons des flacons. Changer de pipettes ou d'embouts entre chaque échantillon.
11. Ne pas laisser sécher les puits entre les différentes étapes.
12. Protéger les lames des rayons du soleil ou de la lumière directe pendant l'incubation.
13. Le matériel en plastique contaminé doit être éliminé par incinération. La verrerie contaminée doit être stérilisée à 121°C pendant 30 minutes à l'autoclave ou décontaminée avec une solution d'eau de Javel à 2,5% (v/v). Les projections doivent être éliminées à l'aide d'un matériel absorbant et la zone de manipulation désinfectée avec de l'eau de Javel à 5% (v/v). Tous les liquides contaminés doivent être désinfectés de manière appropriée à l'aide d'eau de Javel ou par autoclavage.
14. Protéger le conjugué FITC des UV, de la fluorescence et des rayons du soleil. Conserver le conjugué à l'obscurité.
15. Éliminer les échantillons de sérums contaminés par des micro-organismes.
16. L'azoture de sodium utilisé comme conservateur est un produit toxique en cas d'ingestion. L'azoture de sodium peut réagir avec les conduites en plomb ou en cuivre et former des sels explosifs. Disposer toujours d'un système de rinçage à l'eau suffisamment important.

Procédure

1. Ramener le matériel à température ambiante (min à 20° C) avant utilisation.
2. Reconstituer un sachet de poudre de tampon PBS dans 1 litre d'eau distillée ou de qualité supérieure.
3. Diluer le diluant du sérum au 1/5 dans de l'eau distillée (ex: 20 mL de diluant + 80mL d'eau distillée)
Dilution des échantillons de patient:
Pour les IgG:
1/160 avec le diluant de sérum
Ex: 5 µL de sérum + 795 µL de diluant de sérum
Pour les IgM:
1/40 avec le diluant de sérum
Ex: 5 µL de sérum + 195 µL de diluant de sérum
Pour la recherche d'IgM utiliser l'absorbant du FR (MASTSORB Code 651003) pour réduire les interférences notamment avec le facteur rhumatoïde.
Ne pas absorber les contrôles.
4. Les contrôles sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être dilués.
5. Préparer soigneusement le nombre de lames nécessaires et les identifier. Éviter de toucher les puits. Déposer les lames en chambre humide.
6. Déposer 20 à 25 µL d'échantillon et de contrôles prêts à l'emploi respectivement dans chaque puits selon un plan de travail établi. S'assurer que tous les puits sont recouverts et que les sérums ne débordent pas des puits. Éviter le contact direct des embouts de la micropipette avec la surface de la lame afin de ne pas endommager le substrat.
7. Incuber les lames en chambre humide fermée :
IgG : 30 min à température ambiante
IgM : 45 min à température ambiante
8. Après incubation, laver soigneusement les lames avec du tampon PBS en évitant de diriger le jet de la pissette directement sur les puits. Pour cela, laver les puits de 1 à 5 dirigés vers le bas tout en maintenant le jet vers le centre de la lame. Laver les puits 6 à 10 de la même manière.
9. Immerger les lames dans le bac à coloration ou dans la jarre de Coplin contenant du tampon PBS sous agitation magnétique pendant 15 minutes avec un changement de tampon PBS au bout de 5 minutes.
10. Sortir les lames une à une du bac à coloration et éliminer le PBS en excès. Sécher les lames autour des puits à l'aide d'un papier buvard. Sécher l'excès de PBS sur le dos de la lame. Ne pas toucher la surface des puits.
11. Transférer immédiatement la lame dans une chambre humide. Déposer 20 à 25 µL de conjugué FITC (polyvalent) dans chaque puits. Vérifier que tous les puits sont bien recouverts de conjugué.
12. Incuber les lames à température ambiante dans une chambre humide fermée pendant 30 minutes à l'obscurité (même incubation pour les IgG et IgM).
13. Allumer le microscope 15 minutes avant utilisation.
14. Après incubation, laver les lames avec du PBS en répétant les étapes 9 et 10.

- Déposer une petite goutte de milieu de montage dans chaque puits. Recouvrir d'une lamelle et lire les résultats immédiatement. Eviter de piéger des bulles d'air entre la lame et la lamelle. Un excès de milieu de montage sur la lame peut engendrer un important bruit de fond dû à la dispersion de la lumière. Eliminer l'excès de milieu de montage avec du papier absorbant en évitant de déplacer la lamelle.
- Examiner sous microscope à fluorescence au grossissement 400X ou 800X.

Interprétation

Validation du test

Examiner les contrôles avant de lire les résultats des échantillons de patients. Les contrôles doivent être validés selon les profils de fluorescence donnés dans le tableau suivant :

Les sérums de patients sont comparés aux contrôles du kit.

| Echantillon | Intensité de fluorescence |
|----------------------|---------------------------|
| Contrôle positif IgG | 3 + à 4 + |
| Contrôle positif IgM | 2 + à 3 + |
| Contrôle négatif | négatif |

Interprétation des résultats

Echantillon positif en IgG : fluorescence verte homogène de toutes les *Borrelia* actives. Les *Borrelia* moins actives donnent parfois une fluorescence verte faible à ne pas prendre en considération.

Echantillon négatif en IgG absence de fluorescence verte, une coloration verte sans fluorescence ou une faible fluorescence (principalement au bord du puits) peut apparaître.

Echantillon positif en IgM fluorescence verte homogène de toutes les *Borrelia* actives. Les *Borrelia* moins actives donnent parfois une fluorescence verte faible à ne pas prendre en considération.

Echantillon négatif en IgM absence de fluorescence verte, coloration verte sans fluorescence ou une faible fluorescence (principalement au bord du puits) peut apparaître.

IgG- $\geq 1/160$ et IgM $\geq 1/40$

Infection ancienne probable, réinfection ou début d'infection possible.

IgG $\geq 1/320$ et IgM $\geq 1/80$

Réinfection aiguë ou récente probable, réactivation possible.

Limites / Réactions croisées

- Réactions croisées avec les spirochètes, particulièrement avec *T. pallidum* donnant des résultats faussement positifs. En cas de résultats positifs ou douteux il est recommandé d'exclure les infections par des germes ayant des réactions croisées.
- Possibilité d'éliminer les réactions croisées en utilisant un absorbent des spirochètes.
- Les titres faibles en anticorps anti-*Borrelia* pour des échantillons préalablement absorbés peuvent ne pas être détectés.
- MASTAFLUOR™ *Borrelia* est très sensible et très spécifique; cependant, les résultats doivent être interprétés avec tous les tests sérologiques, les données cliniques et autres du patient cliniquement significatives.

Performance

Comparaison des résultats de MASTAFLUOR™ *Borrelia* avec d'autres méthodes (ex : ELISA):

| | IgG | IgM |
|-------------|---------|--------|
| Sensibilité | 95,2 % | 57,1 % |
| Spécificité | 98,75 % | 97,8 % |

Les variations inter et intra lots ne sont pas détectables par comparaison avec l'intensité de fluorescence du contrôle.

Références

- Putzker M, Sauer H: Labordiagnostik von Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Klin. Lab., 41: 431-439(1995).
- Tilton RC, Ryan RW: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, J of Clin Immunoassay, 16: 208-214 (1993).
- Blenk H: Serodiagnostik der Lyme-Borreliose, mta, 8(6): 575-580 (1993).
- 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).
- Thomas L: Labor und Diagnose, 5.Auflage (1998) TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt.

Erläuterungen zu den auf den Etiketten verwendeten graphischen Symbolen:

Explanations of abbreviations and icons used on labels:

Explications des abréviations et icônes sur les étiquettes:

| | | | |
|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| SLIDES | Objekträger | Slides | Lames |
| CONTR + | Positive Kontrolle | Positive control | Contrôle positif |
| CONTR - | Negative Kontrolle | Negative control | Contrôle négatif |
| CONJ | FITC-Konjugat | FITC-conjugate | FITC Conjugué |
| BUFFER | PBS Waschpuffer | PBS Washing buffer | Tampon de lavage PBS |
| DIL | Serumdiluent | Serum diluent | Diluant du Sérum |
| EVANS Blue | Evans Blau | Evans Blue | Bleu d'Evans |
| MOUNTNG MEDIUM | Eindeckmedium | Mounting Medium | Milieu de montage |
| LOT | Charge | Batch | Lot |
| REF | Bestellnummer | Order code | Code |
| AHG | Anti-Human-Globulin | Anti-human globulin | Antiglobuline humaine |
| RTU | Gebrauchsfertig | Ready to use | Prêt à l'emploi |
|  | Gebrauchsinformation beachten | Read instructions for use | Lire la notice d'utilisation |
|  | Wichtige Hinweise beachten | Important notes | Remarques importantes |
|  | Verfallsdatum | Expiry Date | Date de péremption |
|  | Lagerung bei | Storage | Conservation |