

ImmuneNetics® C6 Lyme ELISA™ Kit
Cat. No.: DK-E601-096
96 Tests
For *In Vitro* Diagnostic Use

SUMMARY:

Lyme disease is a multi-system illness caused by infection with any of the three genospecies of the spirochete *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2}, including *B. burgdorferi*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. Transmission of the disease occurs through the bite of any of several species of *Ixodes* ticks, which are found in the United States³⁻⁵, Europe⁶, Russia, and other countries in Asia.

As it progresses through various stages, Lyme disease produces an array of clinical symptoms^{2,7}. The first sign of infection (primary stage) is the development of a circular skin rash, termed 'erythema migrans' (EM) at the bite site. This occurs in 60-80% of patients within a few days or weeks of the initial infection; some patients do not develop or may overlook it. General flu-like symptoms (headache, abdominal pain, and fatigue) frequently accompany or follow this rash. Weeks to months later, the disease evolves into its secondary stage. This stage is usually characterized by musculoskeletal pain or arthritis, neurological abnormalities and/or cardiac complications. Brief arthritic attacks affecting large joints become more persistent with time and may resolve into a chronic condition in late infection (tertiary stage). Other manifestations of late stage infection include Acrodermatitis Chronica Atrophicans, a skin lesion, and various neurological disorders associated with neuroborreliosis.

Serological testing has been demonstrated to be useful in detecting the antibody response to *B. burgdorferi* as an adjunct to diagnosis. In most Lyme patients, an antibody response to spirochetal antigens can be detected within weeks after infection. The sensitivity and specificity of the response as well as the time course and antibody class vary depending on the antigen.

The antigen used in the ImmuneNetics® C6 Lyme ELISA™ Kit is a synthetic peptide (C6 peptide*) derived from the VlsE protein, which has been shown to be both specific and highly immunogenic¹³⁻²⁰. The peptide sequence is conserved and equally antigenic in humans infected with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* or with European genospecies including *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*⁶. As the antigen represents a defined sequence within the protein, potential cross-reactivity with unrelated and partially related antigens found in other organisms is greatly reduced.

*U.S. Patents 6,475,492, 6,719,983, and 6,740,744 and International Patents.

PRINCIPLE:

The ImmuneNetics® C6 Lyme ELISA™ Kit is based on a synthetic peptide antigen (C6 peptide) in microwell ELISA format. In the assay procedure, diluted serum samples are added to and incubated in wells of an antigen-coated microwell plate. Antibodies specific to the C6 peptide in the serum sample are bound by the immobilized antigen and unbound antibodies are removed by wash steps. The bound antibodies are detected by addition of a horseradish peroxidase-conjugated (HRP) goat anti-human IgG/IgM conjugate. After removal of excess conjugate by further wash steps, a chromogenic peroxidase substrate containing tetramethylbenzidine (TMB) is added. A blue-green product is produced in wells where antibodies have been bound to the antigen. The color development reaction is quenched by addition of dilute sulfuric acid, producing a yellow color change, after which optical absorbance at 450nm, corrected by a 590 – 650nm background subtraction, is measured in each well using an ELISA microplate reader.

REAGENTS SUPPLIED:

1. Microwell Plate (Part # CB-P005-096). 96 wells, provided in twelve strips each containing 8 wells and stored in a resealable foil pouch with desiccant.
2. Positive Control (0.300mL) (Part # CB-L018-300). Human source material with Gentamicin and ProClin added as preservatives.
3. Negative Control (0.300mL) (Part # CB-N023-300). Human source material with Gentamicin and ProClin added as preservatives.
4. Cutoff Calibrator (0.300mL) (Part # CB-N030-300). Human source material with Gentamicin and ProClin added as preservatives. Used to calibrate the cutoff value of the assay.
5. Conjugate (15mL) (Part # CB-A028-015). Ready to use goat anti-human IgG/IgM horseradish peroxidase conjugate.
6. Sample Diluent (30mL) (Part # CC-S004-030). Ready to use dilution buffer containing Gentamicin and ProClin as preservatives.
7. TMB ELISA Substrate (15mL) (Part # CC-S003-015). Ready to use solution containing hydrogen peroxide and TMB.
8. 10X Wash Buffer Concentrate (60mL) (Part # CC-B001-060). Contains phosphate-buffered saline and Tween-20 detergent, with ProClin added as a preservative.
9. Stop Solution (15mL) (Part # CC-S005-015). Ready to use acidic solution.

PRECAUTIONS:

1. The human source materials used in this kit have tested negative by FDA approved methods for antibodies to HIV-1 and HIV-2, Hepatitis C and Hepatitis B surface antigen. However, because no test methods can offer complete assurance that those infectious agents are absent, all controls and test specimens should be handled as if capable of transmitting infectious agents. They should be considered as potentially infectious materials and handled at the Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/National Institutes of Health manual "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition*", 1999.
2. Wear proper personal protection while running the assay. Do not allow reagents to come into contact with skin, eyes or mouth, as irritation may result. Wash thoroughly with water in the event of any contact. Do not mouth pipette reagents.
3. Cap controls and calibrator tightly after use to minimize evaporation.
4. Stop Solution contains sulfuric acid. Waste containing Stop Solution should be brought to neutral pH before disposal. Caution: The addition of sodium hypochlorite (bleach) to solutions containing sulfuric acid will produce toxic chlorine gas.
5. Use fresh pipet tips for pipetting each sample and reagent. Re-use of pipet tips may introduce contamination.
6. Dispose of used assay reagents and samples by proper biohazard procedures.
7. Do not mix reagents from kits with different lot numbers. Do not use kit components beyond the expiration date on the label.
8. All kit components should be brought to room temperature (19 – 26°C) prior to starting the assay.
9. TMB ELISA Substrate is sensitive to light and metallic ions. Avoid exposure to light and metallic ions.
10. Use only distilled or deionized water for preparation of buffers in the assay.
11. Wear gloves when handling microwell plate strips.
12. For optimal, reproducible and accurate performance of the test, follow instructions in package insert. Deviations from instructions in this insert may lead to false results.
13. Do not pre-wash wells with Wash Buffer or Sample Diluent.
14. Do not mix bottle caps of TMB ELISA Substrate and Conjugate.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED:

1. Graduated cylinders to measure liquid
2. 1 liter flask for Wash Buffer
3. Pipettors to dispense 10µL to 200µL (multichannel pipettor recommended or 10µL, 100µL and 200µL pipettes)
4. Uncoated microwell plate or test tubes for sample dilution
5. Distilled or deionized water
6. Timer (0 – 60 minutes)
7. ELISA reader with 450nm filter and a 590 – 650nm reference filter
8. Vacuum aspirator or disposal means for assay solutions (multichannel aspirator recommended)
9. Absorbent towels
10. Centrifuge that is capable of 10,000 rpm

OPTIONAL EQUIPMENT:

1. Automated plate washer

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS:

1. Store unopened kit between 2 – 8°C. Expiration date is shown on the kit label.
2. Unused microplate strips should be stored between 2 – 8°C sealed within the original foil pouch with desiccant.
3. Kit components including Controls, Calibrator, HRP Conjugate, Substrate, Stop Solution, Sample Diluent, and 10X Wash Buffer Concentrate should be stored between 2 – 8°C.
4. 1X (working) Wash Buffer solution can be stored at room temperature (19 – 26°C) for up to 30 days.
5. TMB ELISA Substrate should be stored in light protective bottles that do not contain metallic ions. The shelf life of the substrate is based on storage in the plastic amber bottle that is provided with the kit.
6. Do not use kit components beyond the expiration date.

SPECIMEN COLLECTION:

1. Fresh human serum specimens should be collected and either stored at 2 – 8°C if testing will take place within 10 days, or frozen.
2. Hemolyzed or lipemic sera, and sera subject to multiple freeze-thaw cycles may yield anomalous results.
3. Centrifuge sera for 1 minute at 10,000 rpm in a microcentrifuge to remove any visible precipitate prior to testing.
4. Do not test samples showing evidence of microbial contamination.
5. The assay is intended for use with human serum. The use of plasma with this assay has not been established.

REAGENT, CONTROL, CALIBRATOR, AND SAMPLE PREPARATION:

1. 1X Wash Buffer: To prepare once, add 60mL of 10X Wash Buffer Concentrate to 540mL deionized/distilled water in a 1-liter flask and stir thoroughly. **Note:** On removal of the 10X Wash Buffer Concentrate from refrigeration, undissolved salts may be present. Allow the reagent to reach room temperature and shake the bottle to dissolve the salts.
2. Controls and Calibrator: Centrifuge Controls and Calibrator at 10,000 × g for 10 seconds before using to deposit all liquid at the bottom of the tube. (Prior to dispensing, if Controls are noticed to be excessively cloudy, have evidence of clotting

- or are difficult to pipette, centrifuge a second time for 1 minute at 10,000 rpm.) Dispense 200µL of Sample Diluent into 3 clean test tubes or uncoated microplate wells. Add 10µL of Negative Control to one tube or well; add 10µL of Positive Control to another tube or well; add 10µL of Calibrator to a third tube or well and mix thoroughly.
3. Patient samples: Dispense 200µL of Sample Diluent into each of a series of tubes or uncoated microplate wells, sufficient for the number of samples to be tested. Add 10µL of each sample to the corresponding tube or well and mix thoroughly.

ASSAY PROCEDURE:

Bring all assay reagents to room temperature (19 – 26°C) before beginning the assay. All steps are performed at room temperature (19 – 26°C).

1. Record the sample identity for each well on the provided record sheet to determine the number of strips necessary to perform the assay. Three wells will be needed for controls and calibrator. One well will be needed for each sample.
2. Remove the microplate frame containing the microplate strips from the foil pouch. Remove unneeded microplate strips from the frame and reseal unused strips in the foil pouch with desiccant. The microplate frame should be retained at the end of the assay to be used with the remaining microplate strips.
3. Add 100µL diluted Positive Control to one microwell, 100µL of diluted Negative Control to another microwell and 100µL of diluted Calibrator to a third microwell.
4. Add 100µL of each diluted patient sample to microwells.
5. Incubate for 30 minutes.
6. Aspirate wells. If using manual or semi-automated washing manifold, wash three times as follows. Dispense approximately 300µL of 1X Wash Buffer into each well, then aspirate. Refill the wells with approximately 300µL of 1X Wash Buffer and aspirate a second time. Refill the wells with 300µL of 1X Wash Buffer and aspirate a third time. Make sure that all wells have been aspirated after the third (final) wash step. (If an automated plate washer is used, wash four times with each wash consisting of 300-350µL of 1X Wash Buffer.) After the final wash for both manual and automated washing, tap the plate on absorbent towels to remove all residual liquid.
7. Dispense 100µL Conjugate into each well.
8. Incubate for 20 minutes.
9. Aspirate wells. Wash the wells with 1X Wash Buffer as in Step 6 above.
10. After the final wash tap the plate on absorbent towels to remove all residual liquid.
11. Dispense 100µL Substrate into each well.
12. Incubate for 4 minutes. Please note: Optimal assay performance requires precise timing of the Substrate incubation step; timing should be measured from the addition to the first well.
13. Dispense 100µL Stop Solution into each well in the same order as substrate was dispensed in previous step. Tap plate gently to mix contents of wells. Read absorbance values within 5 minutes.
14. Read Absorbance at 450nm with a reference filter of 650nm using an ELISA plate reader. If the reader is not equipped with a 650nm filter, the use of an alternate filter between 590 – 650nm will provide equivalent results.

QUALITY CONTROL:

1. Control values must be within the following ranges in order for the assay to be considered valid:
2. Negative Control $A_{450-650nm}$ must be <0.18 .
3. Calibrator $A_{450-650nm}$ must be <0.18 .
4. Positive Control $A_{450-650nm}$ must be >1.2 .
5. If any control $A_{450-650nm}$ value is not within the above ranges, the assay should be repeated.

CALCULATIONS:

1. Calculate the assay cutoff value by adding 0.3 to the Calibrator absorbance value.
2. Calculate the Lyme Index value (LI) for each patient sample by dividing the $A_{450-650nm}$ of the sample by the cutoff value.

INTERPRETATION OF RESULTS:

| <u>Lyme Index</u> | <u>Interpretation</u> |
|-------------------|--|
| ≤ 0.90 | Negative result. No antibody to C6 peptide detected in the present assay. This result does not exclude the possibility of <i>B. burgdorferi s.l.</i> infection, and where early Lyme disease is suspected, a second sample should be drawn 2 – 4 weeks later and re-tested. |
| 0.91 – 1.09 | Equivocal result. The imprecision inherent in any method implies a lower degree of confidence in the interpretation of samples with $A_{450-650nm}$ values very close to the calculated cutoff value. For this reason an equivocal category has been designated. Samples yielding equivocal results should be retested. If retesting yields an equivocal result, a new serum specimen should be obtained and tested. |
| ≥ 1.10 | Positive result. Antibody to C6 peptide detected in the present assay. |

The cutoff is determined for each assay run by adding 0.3 to the Calibrator absorbance value. In this way, the cutoff is intended to compensate for run-to-run assay variations, which might otherwise affect sensitivity and specificity. The calibrator has been designed to yield an absorbance value reflecting the background reactivity of normal sera.

LIMITATIONS:

1. A negative result does not exclude the possibility of infection with *B. burgdorferi s.l.*. Patients in early stages of Lyme disease and those who have been treated with antibiotics may not exhibit detectable antibody titers. Patients with clinical history, signs or symptoms suggestive of Lyme disease should be re-tested in 2-4 weeks in the event that the initial test result is negative.
2. A positive result is not definitive evidence of infection with *B. burgdorferi s.l.*. It is possible that other disease conditions may produce artifactual reactivity in the assay.
3. This assay should not be used to screen the general population. The predictive value of the assay is a function of the pre-test probability of Lyme disease in the population tested. Hence, only patients with clinical symptoms of Lyme disease or suspected exposure to *B. burgdorferi s.l.* should be tested.
4. Hemolyzed, lipemic, bilirubinemic or turbid samples may produce artifactual assay results. A fresh sample should be collected for re-testing.
5. Although special training is not needed, optimal performance requires strict adherence to the assay procedure described in the insert. Deviations from the procedure may lead to aberrant results.
6. False positive results may be obtained with sera from patients with diseases other than Lyme disease including syphilis, periodontal disease, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and other autoimmune or infectious diseases.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS:

The performance of the C6 Lyme ELISA™ Kit was compared with that of the Two-Tier protocol recommended by the CDC¹² (samples found positive or equivocal on ELISA are retested by IgG and IgM Western Blot to determine the final result) with respect to specificity and sensitivity of detection.

SPECIFICITY:

Serum specimens were obtained from 1,842 normal blood donors, comprising 1,329 sera from individuals residing in regions endemic for Lyme disease (northeastern U.S.) and 513 sera from individuals residing in areas considered non-endemic for Lyme disease (southwestern U.S.). Sera were tested on the C6 Lyme ELISA™ Kit and by Two-Tier protocol using a whole cell sonicate ELISA in the first step (Table 1). The specificity of the C6 Lyme ELISA™ Kit was statistically equivalent to that of the Two-Tier protocol for both endemic and non-endemic healthy blood donors ($p>0.05$).

See Appendix: Table 1. Reactivity in Endemic and Non-Endemic Blood Donors

SENSITIVITY:

A total of 517 well-characterized serum samples were obtained from North American patients who were diagnosed with Lyme disease based on either (1) documented erythema migrans; (2) culture or PCR positive for *B. burgdorferi*; or (3) Lyme arthritis or other symptoms of disseminated Lyme disease. Positive serology was not a criterion for inclusion in this group.

The C6 Lyme ELISA™ Kit was evaluated in comparison with the Two-Tier protocol on the Lyme patient group. Overall, the C6 Lyme ELISA™ detected 74.9% of the Lyme patients, compared with 55.3% found positive by the Two-Tier protocol (Tables 2 and 3). The sensitivity of the C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier protocol for detection of Lyme patients with positive culture is shown in Table 3.

See Appendix: Table 2. C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier protocol

See Appendix: Table 3. Sensitivity by Sample Definition Criteria

The sensitivity of the C6 Lyme ELISA™ Kit for detection of antibodies to *B. burgdorferi* in Lyme patient sera was also evaluated with respect to symptom category. A comparison of sensitivity in the C6 Lyme ELISA™ and the Two-Tier protocol is shown in Table 4.

See Appendix: Table 4. Sensitivity by Symptom Category

Lyme patient samples stratified by time after onset of illness were tested on the C6 Lyme ELISA™ Kit vs. the Two-Tier protocol as shown in Table 5.

See Appendix: Table 5. Sensitivity by Time after Onset

An analysis of reactivity in the subset of IgG and IgM Western Blot-positive Lyme patients showed that 100% of patients with positive IgG Western Blot ($n=157$) and 95.8% of patients with positive IgM Western Blot ($n=192$) were also positive by C6 Lyme

ELISA™ (Table 6). Conversely, 47.5% of patients positive on C6 Lyme ELISA™ (n=387) were positive on IgM Western Blot, and 40.7% (n=386) were positive on IgG Western Blot.

See Appendix: Table 6. C6 Lyme ELISA™ vs. Western Blot Results

PROSPECTIVE STUDY RESULTS:

A prospective study was performed on 1,276 serum samples serially received at two reference laboratories for Lyme screening tests. Sera were tested on the C6 Lyme ELISA™ and with the Two-Tier protocol (Table 7). Concordant results were found in 98.5% of the specimens tested.

See Appendix: Table 7. Prospective Samples: C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier Results

CROSS-REACTIVE CONDITIONS:

Sera from 366 individuals with disease conditions other than Lyme disease were tested for cross-reactivity in the C6 Lyme ELISA™. Results for seventeen conditions are provided in Table 8. Two sera were found positive by both C6 ELISA and Two-Tier protocol, while one additional serum was positive by Two-Tier protocol only (Table 9). The C6 Lyme ELISA™ demonstrated an overall specificity of 99.5% in all categories.

See Appendix: Table 8. Cross-Reactive Conditions: C6 Lyme ELISA™ Results

See Appendix: Table 9. Cross-Reactive Conditions: C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier protocol

REPRODUCIBILITY:

Reproducibility was tested on a panel of 8 specimens, including the kit Positive and Negative Controls and 6 specimens representing 2 negative, 2 weakly reactive and 2 positive sera. Reproducibility was assessed in four analyses: intra-assay, inter-assay, inter-lot, and inter-site. Results from each of these analyses is summarized in the following table.

See Appendix: Table 10. Reproducibility: C6 Lyme ELISA™ Results

IMMUNETICS, INC. CONTACT INFORMATION:

Immunetics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tel.: 800-227-4765 or 617-896-9100
Fax: 617-896-9110
Email: info@immunetics.com

Contact Immunetics, Inc. for available translations in other languages.

EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: (32) 2.732.59.54
Fax: (32) 2.732.60.03
Email: mail@obelis.net



Trousse Immunetics® C6 Lyme ELISA™
Cat. No.: DK-E601-096
96 tests
Pour le diagnostic *in vitro* uniquement

RÉSUMÉ :

La maladie de Lyme est une pathologie multisystémique causée par une infection à l'une des trois souches de spirochète *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2}, à savoir *B. burgdorferi*, *B. garinii* et *B. afzelii*. La transmission de la maladie s'effectue par piqûre de tiques de diverses espèces du genre *Ixodes*, rencontrées aux États-Unis³⁻⁵, en Europe⁶, en Russie et dans certains pays asiatiques.

Les symptômes cliniques varient en fonction du stade de la maladie^{2,7}. Le premier signe d'infection (stade primaire) est l'apparition d'une éruption cutanée circulaire, appelée « erythema migrans » (EM), à l'endroit de la piqûre. Ceci se produit chez 60-80 % des patients quelques jours ou quelques semaines après l'infection initiale ; certains patients n'ont pas cette réaction ou peuvent ne pas s'en rendre compte. Cette éruption cutanée est fréquemment accompagnée ou suivie de symptômes pseudo-grippaux généraux (céphalées, douleurs abdominales et asthénie). Quelques semaines à quelques mois plus tard, la maladie atteint son deuxième stade. Ce stade est généralement caractérisé par des douleurs musculo-squelettiques ou de l'arthrite, des anomalies neurologiques et/ou des complications cardiaques. De brèves poussées d'arthrite affectant les articulations importantes deviennent plus persistantes au cours du temps et peuvent donner lieu à une affection chronique au stade suivant de l'infection (stade tertiaire). Parmi les manifestations tertiaires figurent l'acrodermatite chronique atrophique, une lésion cutanée et divers troubles neurologiques associés à la neuroborréliose.

Des tests sérologiques se sont avérés utiles pour détecter les anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* et aider ainsi au diagnostic. Chez la plupart des patients atteints de la maladie de Lyme, des anticorps dirigés contre les antigènes spirochètiens peuvent être détectés quelques semaines après l'infection. La sensibilité et la spécificité de la réponse, ainsi que l'évolution au cours du temps et la classe d'anticorps, varient en fonction de l'antigène.

L'antigène utilisé dans la trousse Immunetics® C6 Lyme ELISA™ est un peptide de synthèse (peptide C6*) dérivé de la protéine VlsE, identifiée comme étant à la fois spécifique et hautement immunogène¹³⁻²⁰. La séquence peptidique est conservée et possède un pouvoir antigénique similaire chez les sujets infectés par *Borrelia burgdorferi sensu stricto* ou des souches européennes, notamment *Borrelia afzelii* et *Borrelia garinii*¹⁶. Étant donné que l'antigène représente une séquence définie au sein de la protéine, le potentiel de réactivité croisée avec des antigènes n'ayant aucune relation ou ayant simplement une relation partielle, provenant d'autres organismes, est considérablement réduit.

*Brevets américains 6,475,492, 6,719,983, et 6,740,744 et brevets internationaux.

PRINCIPE :

La trousse Immunetics® C6 Lyme ELISA™ est basée sur un antigène, à savoir un peptide de synthèse (peptide C6), et utilise le format de micropuits ELISA. Dans la procédure de test, des échantillons de sérum dilué sont ajoutés puis incubés dans les micropuits d'une plaque de microtitration enduite d'antigène. Les anticorps spécifiques du peptide C6 dans l'échantillon de sérum sont liés par l'antigène immobilisé, tandis que les anticorps non liés sont éliminés par plusieurs étapes de lavage. Les anticorps liés sont détectés par addition d'un sérum de chèvre anti-IgG et IgM humaines conjugué à la peroxydase de raifort. Après élimination par lavage du conjugué en excès, un substrat de peroxydase chromogénique contenant du TMB (tétra-méthylbenzidine) est ajouté. Une coloration bleu-vert apparaît dans les puits où les anticorps se sont liés à l'antigène. La réaction colorée est désactivée par l'addition d'acide sulfurique dilué, qui produit une coloration jaune. La densité optique à 450 nm, corrigée par une soustraction du bruit de fond de 590 à 650 nm, est mesurée dans chaque puits à l'aide d'un lecteur de microplaque ELISA.

RÉACTIFS FOURNIS :

1. Plaque de microtitration (réf. CB-P005-096). 96 puits répartis sur 12 bandes de 8 puits et stockés dans un sachet en aluminium refermable avec dessiccant.
2. Contrôle positif (0,300 ml) (réf. CB-L018-300). Produit d'origine humaine avec conservateurs (gentamicine et ProClin).
3. Contrôle négatif (0,300 ml) (réf. CB-N023-300). Produit d'origine humaine avec conservateurs (gentamicine et ProClin).
4. Calibrateur de valeur seuil (0,300 ml) (réf. CB-N030-300). Produit d'origine humaine avec conservateurs (gentamicine et ProClin). Utilisé pour calibrer la valeur seuil du test.
5. Conjugué (15 ml) (réf. CB-A028-015). Sérum de chèvre anti-IgG et IgM humaines conjugué à la peroxydase de raifort, prêt à l'emploi.
6. Diluant d'échantillon (30 ml) (réf. CC-S004-030). Tampon de dilution prêt à l'emploi avec conservateurs (gentamicine et ProClin).
7. Substrat TMB ELISA (15 ml) (réf. CC-S003-015). Solution prête à l'emploi contenant de l'eau oxygénée et du TMB.
8. Tampon de lavage concentré 10X (60 ml) (réf. CC-B001-060). Contient un tampon phosphate salin et le détergent Tween-20, avec conservateur (ProClin).

9. Solution d'arrêt (15 ml) (réf. CC-S005-015). Solution acide prête à l'emploi.

PRÉCAUTIONS :

1. Les produits d'origine humaine utilisés dans cette trousse ont été testés négatifs pour les anticorps anti-VIH-1, anti-VIH-2, anti-VHC et l'antigène de surface de l'hépatite B selon des techniques agréées par la FDA. Néanmoins, aucune méthode de test n'est en mesure de garantir totalement l'absence de ces agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de contrôle et de test doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Ils doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés conformément aux règles de sécurité biologique de niveau 2 (Biosafety Level 2) recommandées par le manuel du Centers for Disease Control/National Institute of Health, « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », 4^e édition, 1999.
2. Porter un équipement de protection personnelle approprié pour effectuer le test. Ne pas laisser les réactifs entrer en contact avec la peau, les yeux ou la bouche, ce qui pourrait donner lieu à une irritation. En cas de contact, se laver soigneusement avec de l'eau. Ne pas pipeter les réactifs à la bouche.
3. Boucher hermétiquement les contrôles et le calibrateur après utilisation pour éviter l'évaporation.
4. La solution d'arrêt contient de l'acide sulfurique. Les déchets contenant de la solution d'arrêt doivent être ramenés à un pH neutre avant d'être éliminés. Attention : L'addition d'hypochlorite de sodium (eau de Javel) à des solutions contenant de l'acide sulfurique entraîne un dégagement de chlore gazeux toxique.
5. Utiliser des cônes de pipette neufs pour pipeter chaque échantillon et réactif. L'utilisation de cônes de pipette usagés peut contaminer le matériel.
6. Éliminer les réactifs et échantillons utilisés lors du test en respectant les procédures appropriées concernant la sécurité des matières infectieuses.
7. Ne pas mélanger les réactifs de trousse portant des numéros de lot différents. Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption figurant sur l'étiquette.
8. Tous les composants de la trousse doivent être amenés à température ambiante (19 à 26°C) préalablement au test.
9. Substrat TMB ELISA est sensible aux ions légers et métallique. Éviter l'exposition à des ions légers et métalliques.
10. Utiliser uniquement de l'eau distillée ou désionisée pour ce test.
11. Porter des gants lors de la manipulation des bandes de la plaque de microtitration.
12. Pour une performance optimale, reproductible et précise du test, suivre les instructions figurant dans la notice d'utilisation. Tout écart par rapport aux instructions de cette notice peut donner lieu à des résultats erronés.
13. Ne pas prélever les puits à l'aide du tampon de lavage ou du diluant d'échantillon.
14. Ne pas intervertir les bouchons des flacons de substrat TMB ELISA et de conjugué.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI :

1. Éprouvettes graduées pour mesurer les liquides
2. Flacon d'un litre pour le tampon de lavage
3. Pipettes pour le prélèvement de 10 µl à 200 µl de liquide (pipettes multicanaux recommandées ou pipettes de 10 µl, 100 µl et 200 µl)
4. Plaque de microtitration ou tubes à essai non enduits pour la dilution de l'échantillon
5. Eau distillée ou désionisée
6. Minuterie (0 à 60 minutes)
7. Lecteur ELISA avec filtre de 450 nm et un filtre de référence de 590 – 650 nm
8. Aspirateur ou autre mode d'élimination des solutions de test (aspirateur multicanaux recommandé)
9. Serviettes absorbantes
10. Centrifugeuse qui est capable de 10.000 tours par minute

ÉQUIPEMENT FACULTATIF :

1. Dispositif de lavage de plaque automatique

CONDITIONS ET DURÉE DE CONSERVATION DES RÉACTIFS :

1. Conserver la trousse non ouverte entre 2 et 8 °C. La date de péremption figure sur l'étiquette de la trousse.
2. Les bandes de microplaque non utilisées doivent être conservées entre 2 et 8 °C, enfermées dans le sachet en aluminium d'origine avec le dessiccant.
3. Les composants de la trousse, y compris les contrôles, le calibrateur, le conjugué à la peroxydase de raifort, le substrat, la solution d'arrêt, le diluant d'échantillon et le tampon de lavage concentré 10 X, doivent être conservés entre 2 et 8 °C.
4. La solution de tampon de lavage 1 X (de travail) peut être conservée à température ambiante (19 à 26°C) pendant un maximum de 30 jours.
5. TMB Substrat ELISA doit être stocké dans des bouteilles légères de protection qui ne contiennent pas d'ions métalliques. La durée de vie du substrat est basée sur un stockage dans la bouteille ambre en plastique qui est fourni avec le kit.
6. Ne pas utiliser les composants de la trousse au-delà de la date de péremption.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

1. Des échantillons de sérum humain frais doivent être prélevés et conservés à 2 – 8 °C si le test doit avoir lieu sous 10 jours, ou congelés.
2. Les sérums hémolysés, lipémiques ou soumis à plusieurs cycles de congélation-décongélation peuvent conduire à l'obtention de résultats erronés.

3. Centrifuger les sérums pendant une minute à 10 000 tr/min pour éliminer tout précipité visible préalablement au test.
4. Ne pas tester les échantillons présentant des signes de contamination microbienne.
5. Cette trousse est destinée à la réalisation de tests sur le sérum humain. L'utilisation de plasma dans le cadre de cette procédure n'a pas été établie.

RÉACTIF, CONTRÔLE, CALIBRATEUR ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS :

1. Tampon de lavage concentré 1X : pour une préparation unique, ajouter 60 ml de tampon de lavage concentré 10X à 540 ml d'eau désionisée/distillée dans un flacon d'un litre et mélanger soigneusement. **REMARQUE** : Une cristallisation peut se former après conservation au réfrigérateur du tampon concentré 10X. Laisser le réactif revenir à température ambiante et agiter le flacon pour dissoudre les sels.
2. Contrôle et calibrateur : centrifuger les contrôles et le calibrateur à 10 000 × g pendant 10 secondes avant utilisation pour que le liquide se dépose au fond du tube. (Avant de distribution, si les contrôles sont remarqués pour être excessivement trouble, avoir des preuves de la coagulation ou sont difficiles à pipette, centrifuger une deuxième fois pendant 1 minute à 10 000 rpm.) Verser 200 µl de diluant d'échantillon dans trois tubes à essai propres ou puits de microplaque non enduits. Ajouter 10 µl de contrôle négatif à un tube ou puits, ajouter 10 µl de contrôle positif à un autre tube ou puits et ajouter 10 µl de calibrateur à un troisième tube ou puits, puis mélanger soigneusement.
3. Échantillons patients : Verser 200 µl de diluant d'échantillon dans une série de tubes ou puits de microplaque non enduits correspondant au nombre d'échantillons à tester. Ajouter 10 µl de chaque échantillon au tube ou puits correspondants et mélanger soigneusement.

PROCÉDURE DE TEST :

Amener tous les réactifs de test à température ambiante (19 à 26°C) préalablement au test. Toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (19 à 26°C).

1. Noter l'identité de l'échantillon pour chaque puits sur la feuille de registre fournie afin de déterminer le nombre de bandes nécessaires pour réaliser le test. Trois puits seront nécessaires pour les contrôles et le calibrateur. À chaque puits correspond un échantillon.
2. Retirer du sachet en aluminium le cadre de microplaque contenant plusieurs bandes. Retirer du cadre les bandes de la microplaque qui ne sont pas nécessaires et remettre les bandes inutilisées dans le sachet en aluminium avec le dessiccant. Le cadre de la microplaque doit être conservé à la fin du test pour être utilisé avec les bandes restantes de la microplaque.
3. Ajouter 100 µl de contrôle positif dilué à un micropuits, 100 µl de contrôle négatif dilué à un autre micropuits et 100 µl de calibrateur dilué à un troisième.
4. Ajouter 100 µl de chaque échantillon patient dilué aux micropuits.
5. Incuber pendant 30 minutes.
6. Aspirer les puits. Si une rampe de lavage manuelle ou semi-automatique est utilisée, laver trois fois comme suit. Distribuer environ 300 µl de tampon de lavage concentré 1X dans chaque puits et aspirer. Remplir les puits avec 300 µl de tampon de lavage concentré 1X et aspirer une troisième fois. Remplir de nouveau les puits avec 300 µl de tampon de lavage concentré 1X et aspirer une troisième fois. Veiller à ce que tous les puits aient été aspirés après la troisième (dernière) étape de lavage. (If an automated plate washer is used, wash four times with each wash consisting of 300-350µL of 1X Wash Buffer.) Après le dernier lavage, que ce soit manuel ou automatique, tapoter la plaque sur des serviettes absorbantes pour éliminer le liquide résiduel.
7. Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.
8. Incuber pendant 20 minutes.
9. Aspirer les puits. Laver les puits avec un tampon de lavage concentré 1X comme indiqué précédemment, à l'étape 6.
10. Après le dernier lavage, tapoter la plaque sur des serviettes absorbantes pour éliminer le liquide résiduel.
11. Distribuer 100 µl de substrat dans chaque puits.
12. Incuber pendant 4 minutes. Remarque : La réussite du test dépend de l'observation scrupuleuse de la durée d'incubation du substrat. Chronométrer à partir de la distribution du substrat dans le premier puits.
13. Distribuer 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits en suivant le même ordre que pour la distribution du substrat à l'étape précédente. Tapoter doucement la plaque pour homogénéiser le contenu des puits. Lire les valeurs de densité dans les cinq minutes qui suivent.
14. Lire la valeur de densité à 450 nm avec un filtre de référence de 650 nm en utilisant un lecteur de plaque ELISA. Si le lecteur n'est pas équipé d'un filtre de 650 nm, l'utilisation d'un autre filtre de 590 à 650 nm donne des résultats équivalents.

CONTRÔLE DE QUALITÉ :

1. La validité du test n'est garantie que si les valeurs de contrôle sont situées dans les plages suivantes :
2. La valeur $A_{450-650nm}$ du contrôle négatif doit être $< 0,18$.
3. La valeur $A_{450-650nm}$ du calibrateur doit être $< 0,18$.
4. La valeur $A_{450-650nm}$ du contrôle positif doit être $> 1,2$.
5. Si la valeur $A_{450-650nm}$ d'un contrôle n'est pas comprise dans les plages ci-dessus, le test doit être répété.

CALCULS :

1. Calculer la valeur seuil du test en ajoutant 0,3 à la valeur de densité du calibrateur.
2. Calculer la valeur de l'indice de Lyme (Lyme Index) pour chaque échantillon patient en divisant la valeur $A_{450-650nm}$ de

l'échantillon par la valeur seuil.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

| <u>Indice de Lyme</u> | <u>Interprétation</u> |
|-----------------------|--|
| ≤ 0,90 | Résultat négatif. Aucun anticorps dirigé contre le peptide C6 n'est détecté lors du test. Ce résultat n'exclut pas la possibilité d'une infection à <i>B. burgdorferi s.l.</i> , et en cas de suspicion de maladie de Lyme précoce, un deuxième échantillon doit être prélevé dans un délai de deux à quatre semaines en vue d'un nouveau test. |
| 0,91 – 1,09 | Résultat équivoque Le manque de précision inhérent à toute méthode diminue la certitude de l'interprétation des échantillons dont les valeurs $A_{450-650nm}$ sont très proches de la valeur seuil calculée. Les résultats obtenus sont donc équivoques. Dans ce cas, il est nécessaire de répéter le test sur les échantillons concernés. Si un second test donne un résultat équivoque, un nouvel échantillon de sérum doit être prélevé et testé. |
| ≥ 1,10 | Résultat positif. Des anticorps spécifiques du peptide C6 sont détectés lors du test. |

La valeur seuil est déterminée à chaque test en ajoutant 0,3 à la valeur de densité du calibrateur. Ainsi, la valeur seuil permet de compenser les variations d'un test à l'autre qui pourraient affecter la sensibilité et la spécificité. Le calibrateur est conçu pour produire une valeur de densité reflétant la réactivité de fond des sérums normaux.

LIMITES :

1. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à *B. burgdorferi s.l.*. Chez les patients qui sont aux premiers stades de la maladie de Lyme et chez ceux qui ont reçu un traitement antibiotique, le titre d'anticorps peut ne pas être détectable. Les sujets ayant des antécédents, des signes cliniques ou des symptômes suggérant la maladie de Lyme doivent être de nouveau testés dans un délai de deux à quatre semaines si le résultat du premier test est négatif.
2. Un résultat positif n'est pas une preuve irréfutable d'infection à *B. burgdorferi s.l.*. D'autres pathologies peuvent donner lieu à une réactivité artéfactuelle lors du test.
3. Ce test ne doit pas être utilisé pour dépister la maladie au sein de la population générale. La valeur prédictive du test est fonction de la probabilité de maladie de Lyme chez les sujets testés. Par conséquent, seuls les patients présentant des symptômes cliniques de cette affection ou soupçonnés d'avoir été exposés à *B. burgdorferi s.l.* doivent être testés.
4. Les échantillons hémolysés, lipémiques, bilirubinémiques ou troubles peuvent produire des résultats artéfactuels. Un nouvel échantillon doit être prélevé puis testé de nouveau.
5. Bien que la formation spéciale n'est pas nécessaire, la réussite du test dépend du strict respect des procédures décrites dans cette notice. Tout écart par rapport à la procédure peut donner lieu à des résultats aberrants.
6. Le test peut aboutir à des résultats faussement positifs si les patients sont atteints d'autres pathologies que la maladie de Lyme, notamment la syphilis, la parodontopathie, la polyarthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique et autres maladies auto-immunes ou infectieuses.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES :

En termes de spécificité et de sensibilité de détection, la performance de la trousse C6 Lyme ELISA™ a été comparée à celle du protocole à deux niveaux recommandé par le CDC¹² (les échantillons positifs ou équivoques en ELISA sont de nouveau testés par Western Blot IgG et IgM pour confirmer le résultat).

SPÉCIFICITÉ :

Des échantillons de sérum ont été obtenus auprès de 1842 donneurs de sang, dont 1329 individus résidant dans des régions où la maladie de Lyme est endémique (nord-est des États-Unis) et 513 personnes résidant dans des régions où la maladie n'est pas considérée comme endémique (sud-ouest des États-Unis). Les sérums ont été testés par C6 Lyme ELISA™ et selon le protocole à deux niveaux utilisant un ELISA avec traitement sonique de cellules entières (tableau 1). La spécificité de la trousse C6 Lyme ELISA™ est statistiquement équivalente à celle du protocole à deux niveaux pour les donneurs sains des régions endémiques et non endémiques ($p > 0,05$).

Voir l'annexe: Tableau 1. Réactivité chez les donneurs de sang des régions endémiques et non endémiques

SENSIBILITÉ :

Un total de 517 échantillons de sérum caractérisés ont été obtenus auprès de patients d'Amérique du Nord, chez lesquels la maladie de Lyme a été diagnostiquée sur les bases suivantes : (1) erythema migrans avéré, (2) positivité PCR ou en culture à *B. burgdorferi* ou (3) arthrite de Lyme ou autres symptômes de la maladie de Lyme disséminée. La sérologie positive n'était pas un critère d'inclusion dans ce groupe.

La trousse C6 Lyme ELISA™ a été évaluée en comparaison avec le protocole à deux niveaux sur le groupe de patients atteints de la maladie de Lyme. Globalement, le test C6 Lyme ELISA™ a détecté la positivité chez 74,9 % des patients, alors que 55,3 % des patients ont été trouvés positifs avec le protocole à deux niveaux (tableaux 2 et 3). Le tableau 3 illustre la sensibilité du test C6 Lyme ELISA™ par rapport au protocole à deux niveaux dans le dépistage de la maladie de Lyme chez les patients présentant une culture positive.

Voir l'annexe: Tableau 2. Comparaison entre le C6 Lyme ELISA™ et le protocole à deux niveaux
Voir l'annexe: Tableau 3. Sensibilité selon le critère de définition de l'échantillon

La sensibilité du test C6 Lyme ELISA™ dans le dépistage des anticorps dirigés contre *B. burgdorferi* dans le sérum des patients atteints de la maladie de Lyme a également été évaluée en termes de catégories symptomatiques. Le tableau 4 compare la sensibilité du test C6 Lyme ELISA™ et celle du protocole à deux niveaux.

Voir l'annexe: Tableau 4. Sensibilité selon la catégorie symptomatique

Les échantillons de patients atteints de la maladie de Lyme ont été testés par C6 Lyme ELISA™ et selon le protocole à deux niveaux, et comparés en fonction du délai écoulé après l'apparition de la maladie (tableau 5).

Voir l'annexe: Tableau 5. Sensibilité selon le délai écoulé après l'apparition de la maladie

Une analyse de la réactivité dans le sous-groupe de patients positifs au Western Blot IgG et IgM a montré que 100 % des patients positifs au Western Blot IgG (n=157) et 95,8 % des patients positifs au Western Blot IgM (n=192) étaient également positifs au test C6 Lyme ELISA™ (tableau 6). Inversement, 47,5 % des patients positifs au test C6 Lyme ELISA™ (n=387) étaient positifs au Western Blot IgM, et 40,7 % des patients (n=386) étaient positifs au Western Blot IgG.

Voir l'annexe: Tableau 6. Comparaison des résultats du test C6 Lyme ELISA™ et du Western Blot

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE PROSPECTIVE :

Une étude prospective a été réalisée sur 1276 échantillons de sérum séquentiellement reçus par deux laboratoires de référence à des fins des tests de dépistage de la maladie de Lyme. Les sérums ont été testés par C6 Lyme ELISA™ et selon le protocole à deux niveaux (tableau 7). Des résultats concordants ont été obtenus pour 98,5 % des échantillons testés.

Voir l'annexe: Tableau 7. Échantillons prospectifs : comparaison des résultats du test C6 Lyme ELISA™ et du protocole à deux niveaux

RÉACTIONS CROISÉES :

Les sérums de 366 sujets atteints d'une pathologie autre que la maladie de Lyme ont été testés à l'aide du kit C6 Lyme ELISA™ pour détecter les éventuelles réactions croisées. Les résultats relatifs à 17 pathologies sont présentés au tableau 8. Deux sérums ont été trouvés positifs au test C6 ELISA et au protocole à deux niveaux, tandis qu'un autre a été trouvé positif au protocole à deux niveaux uniquement (tableau 9). La trousse C6 Lyme ELISA™ a montré une spécificité globale de 99,5 % dans toutes les catégories.

Voir l'annexe: Tableau 8. Réactions croisées : résultats du test C6 Lyme ELISA™

Voir l'annexe: Tableau 9. Réactions croisées : comparaison du test C6 Lyme ELISA™ et du protocole à deux niveaux

REPRODUCTIBILITÉ :

La reproductibilité a été testée sur un panel de 8 échantillons, dont les contrôles positifs et négatifs de la trousse et 6 échantillons représentant deux sérums négatifs, deux sérums faiblement réactifs et deux sérums positifs. La reproductibilité a été évaluée à l'aide de quatre analyses : intra-test, inter-test, inter-lot et inter-site. Les résultats de chacune des analyses sont présentés dans le tableau suivant.

Voir l'annexe: Tableau 10. Reproductibilité : résultats du test C6 Lyme ELISA™

INFORMATIONS DE CONTACT :

Immunetics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 États-Unis
Téléphone : 800-227-4765 ou 617-896-9100
Télécopie : 617-896-9110
Adresse électronique : info@immunetics.com

REPRÉSENTANT EUROPÉEN AGRÉÉ :

Obelis s.a
Boulevard, Boulevard Général Wahis 53
1030 Bruxelles, BELGIQUE
Téléphone : (32) 2.732.59.54
Télécopie : (32) 2.732.60.03
Adresse électronique : mail@obelis.net



Immunetics® C6 Lyme ELISA™ Kit
Kategorie- Nr.: DK-E601-096
96 Tests
In-vitro-Diagnostikum

ÜBERSICHT:

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, die durch eine Infektion mit einer der drei Genospezies der Spirochäte *B. burgdorferi sensu lato* hervorgerufen wird^{1,2}: *B. burgdorferi*, *B. garinii* und *B. afzelii*. Die Übertragung erfolgt durch den Biss einer von mehreren Zeckenspezies der *Ixodes*-Familie, die in den Vereinigten Staaten³⁻⁵, Europa⁶, Russland und weiteren Ländern in Asien vorkommt.

Im Verlauf der verschiedenen Krankheitsstadien der Lyme-Borreliose kommt es zu einer Reihe klinischer Symptome^{2,7}. Das erste Infektionsanzeichen (Primärstadium) ist die Entwicklung eines kreisrunden Hautausschlags, des „Erythema migrans“ (EM) an der Bissstelle. Es tritt bei 60-80 % der Patienten innerhalb einiger Tage oder Wochen nach der Infektion auf. Manche Patienten entwickeln dieses Symptom nicht oder nehmen es nicht zur Kenntnis. Allgemeine grippeähnliche Symptome (Kopfschmerzen, abdominale Schmerzen und Müdigkeit) sind häufig beobachtete Begleit- oder Folgeerscheinungen dieses Ausschlags. Wochen bis Monate danach entwickelt sich das Sekundärstadium der Erkrankung. Dieses Stadium ist gewöhnlich gekennzeichnet durch Schmerzen des Bewegungsapparats oder Arthritis, neurologische Erscheinungen bzw. kardiologische Komplikationen. Kurze arthritische Erscheinungen an großen Gelenken werden mit der Zeit dauerhafter und können in der späten Infektionsphase (Tertiärstadium) chronisch werden. Zu den weiteren Anzeichen des Spätstadiums der Infektion zählen *Acrodermatitis chronica atrophicans*, eine Hautläsion, sowie verschiedene mit Neuroborreliose assoziierte neurologische Störungen.

Serologische Tests haben sich bei der Erkennung der Antikörperreaktion auf *B. burgdorferi* als hilfreich erwiesen und unterstützen die Diagnose. Bei den meisten Lyme-Patienten lässt sich eine Antikörperantwort gegen Spirochäten-Antigene innerhalb von Wochen nach der Infektion feststellen. Die Empfindlichkeit und Spezifität der Antwort, sowie auch der zeitliche Verlauf und die Antikörperklasse variieren je nach Antigen.

Das im C6 Lyme ELISA™-Kit von Immunetics® zum Einsatz kommende Antigen ist ein aus dem VlsE-Protein gewonnenes synthetisches Peptid (C6-Peptid*), das sich sowohl als spezifisch wie auch als höchst immunogen erwiesen hat¹³⁻²⁰. Die Peptidsequenz bleibt erhalten und ist bei mit *Borrelia burgdorferi sensu stricto* infizierten bzw. bei mit europäischen Genospezies (darunter *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii*)¹⁶ infizierten Personen gleichermaßen antigen. Da das Antigen eine definierte Sequenz innerhalb des Proteins darstellt, wird eine mögliche Kreuzreaktion mit fremden oder teilweise verwandten Organismen vorkommenden Antigenen weitgehend reduziert.

*US-Patente 6,475,492; 6,719,983 und 6,740,744 sowie internationale Patente.

PRINZIP:

Das C6 Lyme ELISA™-Kit von Immunetics® basiert auf einem synthetischen Peptid-Antigen (C6-Peptid) im Mikrowell-ELISA-Format. Bei dem Assay-Verfahren werden verdünnte Serumproben in die Kavitäten einer mit Antigen beschichteten Mikrowell-Platte gegeben und dort inkubiert. Spezifische Antikörper für das C6-Peptid in der Serumprobe werden an das immobilisierte Antigen gebunden; freie Antikörper werden durch Spülvorgänge entfernt. Die gebundenen Antikörper werden durch Zusatz eines Konjugats aus Meerrettichperoxidase (HRP) und Anti-Human-IgG/IgM (Ziege) nachgewiesen. Nach dem Entfernen von überschüssigem Konjugat durch weitere Spülvorgänge wird ein Tetramethylbenziden (TMB) enthaltendes, chromogenes Peroxidase-Substrat hinzugegeben. In Kavitäten, in denen Antikörper an das Antigen gebunden wurden, bildet sich ein blau-grünes Produkt. Die Farbentwicklungsreaktion wird durch Zugabe verdünnter Schwefelsäure gelöscht, wodurch es zu einem gelben Farbumschlag kommt. Anschließend wird die optische Dichte jeder Kavität bei 450 nm (mit Kompensation durch eine Hintergrundsubtraktion von 590-650 nm) unter Einsatz eines ELISA-Mikrotiterplattenlesegeräts gemessen.

IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE REAGENZIEN:

1. Mikrowell-Platte (Best.-Nr. CB-P005-096). 96 Kavitäten auf zwölf Streifen mit jeweils 8 Kavitäten, in einem wieder verschließbaren Folienbeutel mit Trockenmittel.
2. Positive Kontrolle (0,300 ml) (Best.-Nr. CB-L018-300). Humanmaterial mit Gentamicin und ProClin als Konservierungsmittel.
3. Negative Kontrolle (0,300 ml) (Best.-Nr. CB-N023-300). Humanmaterial mit Gentamicin und ProClin als Konservierungsmittel.
4. Cutoff-Kalibrator (0,300 ml) (Best.-Nr. CB-N030-300). Humanmaterial mit Gentamicin und ProClin als Konservierungsmittel. Dient zum Kalibrieren des Cutoff-Werts des Assays.
5. Konjugat (15 ml) (Best.-Nr. CB-A028-015). Gebrauchsfertiges Konjugat aus Anti-Human-IgG/IgM (Ziege) und Meerrettichperoxidase.
6. Probenverdünnungsmittel (30 ml) (Best.-Nr. CC-S004-030). Gebrauchsfertiger Verdünnungspuffer mit Gentamicin und ProClin als Konservierungsmittel.
7. TMB-ELISA-Substrat (15 ml) (Best.-Nr. CC-S003-015). Gebrauchsfertige Lösung mit Wasserstoffperoxid und TMB.

8. 10fach konzentriertes Waschpufferkonzentrat (60 ml) (Best.-Nr. CC-B001-060). Enthält phosphatgepufferte Kochsalzlösung und Tween-20-Reinigungsmittel sowie ProClin als Konservierungsmittel.
9. Stopplösung (15 ml) (Best.-Nr. CC-S005-015). Gebrauchsfertige saure Lösung.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

1. Die für diesen Kit verwendeten Humanmaterialien wurden mit von der US-amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA zugelassenen Methoden auf Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis C und Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und für negativ befunden. Da jedoch keine Testmethode das Vorliegen dieser Infektionserreger mit letzter Sicherheit ausschließen kann, sind alle Kontrollen und Testproben als potenziell infektiös zu erachten und entsprechend zu handhaben. Sie sollten als potenziell infektiöse Materialien angesehen werden und gemäß Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden, wie im Handbuch „*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*“, 4. Ausgabe (1999) der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde CDC/National Institutes of Health empfohlen.
2. Tragen Sie bei der Durchführung des Assays geeignete Schutzkleidung. Lassen Sie keine Reagenzien in Kontakt mit Haut, Augen oder Mund gelangen, denn dies kann zu einer Irritation führen. Spülen Sie im Fall eines Kontakts gründlich mit Wasser. Pipettieren Sie Reagenzien nicht mit dem Mund.
3. Kontrollen und Kalibrator nach Gebrauch fest verschließen, um die Verdunstung auf ein Minimum zu reduzieren.
4. Die Stopplösung enthält Schwefelsäure. Abfall, der Stopplösung enthält, ist vor dem Entsorgen auf einen neutralen pH-Wert zu bringen. Achtung: Bei der Zugabe von Natriumhypochlorit (Bleiche) zu schwefelsäurehaltigen Lösungen entstehen toxische Chlorgase.
5. Für das Pipettieren der einzelnen Proben und Reagenzien jeweils frische Pipettenspitzen verwenden. Durch die Wiederverwendung von Pipettenspitzen kann es zu Kontamination kommen.
6. Entsorgen Sie gebrauchte Assay-Reagenzien und Proben nach entsprechenden Verfahren für biologisch gefährliche Stoffe.
7. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummern nicht gemeinsam verwenden. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums auf dem Etikett.
8. Alle Komponenten des Kits müssen vor Assay-Beginn auf Zimmertemperatur (19-26°C) gebracht werden.
9. TMB-ELISA-Substrat ist lichtempfindlich und Metallionen. Vermeiden Sie die Einwirkung von Licht und Metallionen.
10. Zur Vorbereitung der Assay-Puffer ausschließlich destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.
11. Beim Umgang mit Mikrowell-Plattenstreifen Handschuhe tragen.
12. Befolgen Sie die Anweisungen auf der Packungsbeilage, um optimale, reproduzierbare und präzise Testergebnisse zu erlangen. Ein von den Anweisungen in dieser Beilage abweichendes Vorgehen kann zu falschen Ergebnissen führen.
13. Die Kavitäten nicht mit Waschpuffer oder Probenverdünnungsmittel vorspülen.
14. Die Flaschenverschlüsse von TMB-ELISA-Substrat und Konjugat nicht vertauschen.

ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT IM LIFERUMFANG ENTHALTENE ARTIKEL:

1. Messzylinder für die Flüssigkeitsmessung
2. 1-Liter-Kolben für Waschpuffer
3. Pipetten für die Abgabe von 10 bis 200 µl (es empfehlen sich Mehrkanalpipetten oder 10-, 100- und 200-µl-Pipetten)
4. Unbeschichtete Mikrowell-Platten oder Teströhrchen für die Probenverdünnung
5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
6. Zeitmesser (0-60 Minuten)
7. ELISA-Lesegerät mit 450 nm-Filter und einem 590-650 nm-Referenzfilter
8. Vakuumaspirator oder Entsorgungsmöglichkeit für Assay-Lösungen (es empfiehlt sich ein Mehrkanalaspirator)
9. Saugfähige Tücher
10. Zentrifuge, die in der Lage ist 10.000 Umdrehungen pro Minute

OPTIONALE GERÄTSCHAFTEN:

1. Automatisierte Plattenwaschvorrichtung

LAGERUNG UND HALTBARKEIT VON REAGENZIEN:

1. Lagern Sie das ungeöffnete Kit bei 2-8 °C. Das Verfallsdatum ist auf dem Etikett vermerkt.
2. Ungebrauchte Mikrotiterplattenstreifen müssen zusammen mit Trockenmittel verschlossen im Originalbeutel bei 2-8 °C gelagert werden.
3. Die Kit-Komponenten, darunter Kontrollen, Kalibrator, HRP-Konjugat, Substrat, Stopplösung, Probenverdünnungsmittel und 10fach konzentriertes Waschpufferkonzentrat sind bei 2-8 °C zu lagern.
4. 1fach konzentrierte Waschpufferlösung (Arbeitslösung) kann bis zu 30 Tage lang bei Zimmertemperatur (19-26°C) gelagert werden.
5. TMB-ELISA Substrat sollte in Lichtschutzmittel Flaschen, die keine Metallionen gespeichert werden. Die Haltbarkeit des Substrats bei der Lagerung in der Kunststoff-braune Flasche, die mit dem Kit bereitgestellten basiert.
6. Die Komponenten des Kits nach Ablauf des Verfallsdatums auf dem Etikett nicht mehr verwenden.

PROBENENTNAHME:

1. Frische Humanserum- oder -plasmaproben sollten nach der Entnahme entweder bei 2-8 °C gelagert (sofern die Tests innerhalb von 10 Tagen durchgeführt werden können) oder eingefroren werden.
2. Hämolytische oder lipämische Seren sowie Seren, die mehrere Gefrierzyklen durchlaufen haben, können abnorme Resultate

liefern.

3. Die Seren vor dem Testen 1 Minute lang bei 10.000 U/min in einer Mikrozentrifuge schleudern, um evtl. vorhandene sichtbare Ausfällungen zu beseitigen.
4. Zum Testen keine Proben heranziehen, die Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination aufweisen.
5. Der Assay ist für Humanserum vorgesehen. Der Einsatz von Plasma für diesen Assay ist nicht belegt.

REAGENZEN-, KONTROLLEN-, KALIBRATOR- UND PROBENVORBEREITUNG:

1. 1fach konzentrierter Waschpuffer: Für die einmalige Vorbereitung 60 ml des 10fach konzentrierten Waschpufferkonzentrats in einen 1-Liter-Kolben mit 540 ml deionisiertem/destilliertem Wasser geben und gut verrühren. **Hinweis:** Bei der Entnahme des 10fach konzentrierten Waschpufferkonzentrats aus der Kühlung können ungelöste Salze vorhanden sein. Die Reagenzien Zimmertemperatur erreichen lassen und die Flasche zum Auflösen der Salze schütteln.
2. Kontrollen und Kalibrator: Kontrollen und Kalibrator vor Gebrauch 10 Sekunden lang bei 10.000 g zentrifugieren, so dass sich sämtliche Flüssigkeit am Röhrchenboden sammelt. (Vor der Abgabe, wenn die Kontrollen aufgefallen, sehr trüb ist, haben Beweise der Gerinnung oder sind schwer zu Pipette, Zentrifuge ein zweites Mal für 1 Minute bei 10.000 rpm.) 200 µl Probenverdünnungsmittel in 3 saubere Teströhrchen oder Kavitäten unbeschichteter Mikrotiterplatten geben. 10 µl negative Kontrolle in ein Röhrchen bzw. eine Kavität geben; 10 µl positive Kontrolle in ein anderes Röhrchen bzw. eine andere Kavität geben; 10 µl Kalibrator in ein drittes Röhrchen bzw. eine Kavität geben und gut mischen.
3. Patientenproben: Jeweils 200 µl Probenverdünnungsmittel in eine Reihe von Röhrchen oder Kavitäten unbeschichteter Mikrotiterplatten geben; das Volumen muss für die Anzahl der zu testenden Proben ausreichen. 10 µl jeder Probe in das entsprechende Röhrchen bzw. die entsprechende Kavität geben und gut mischen.

ASSAY-VERFAHREN:

Alle Assay-Reagenzien vor Assay-Beginn auf Zimmertemperatur (19-26 °C) bringen. Alle Schritte werden bei Zimmertemperatur durchgeführt (19-26 °C).

1. Für jede Kavität die Kennzeichnung der Probe auf dem mitgelieferten Arbeitsblatt notieren, um die Anzahl der Streifen zu ermitteln, die zur Durchführung des Assays erforderlich sind. Für Kontrollen und Kalibrator werden drei Kavitäten benötigt. Pro Probe wird eine Kavität benötigt.
2. Den Mikrotiterplattenrahmen mit den Mikrotiterplattenstreifen aus dem Folienbeutel entnehmen. Entfernen Sie nicht benötigte Mikrotiterplattenstreifen aus dem Rahmen und verschließen Sie nicht benötigte Streifen mit dem Trockenmittel wieder im Beutel. Der Mikrotiterplattenrahmen sollte nach Abschluss des Assays zur Weiterverwendung mit den übrigen Mikrotiterplattenstreifen aufbewahrt werden.
3. In eine Mikrokavität 100 µl verdünnte positive Kontrolle geben, 100 µl verdünnte negative Kontrolle in eine weitere Mikrokavität und 100 µl verdünnten Kalibrator in eine dritte Mikrokavität.
4. 100 µl jeder verdünnten Patientenprobe in Mikrokavitäten geben.
5. 30 Minuten lang inkubieren.
6. Den Inhalt der Kavitäten aspirieren. Bei Verwendung eines manuellen oder halbautomatischen Spülsystems dreimal wie folgt spülen: In jede Kavität ca. 300 µl 1fach konzentrierten Waschpuffer geben und anschließend aspirieren. Die Kavitäten erneut mit ca. 300 µl 1fach konzentriertem Waschpuffer füllen und ein zweites Mal aspirieren. Die Kavitäten erneut mit 300 µl 1fach konzentriertem Waschpuffer füllen und ein drittes Mal aspirieren. Vor dem dritten (letzten) Spülvorgang sicherstellen, dass alle Kavitäten aspiriert wurden. (Falls eine automatisierte Plattenwaschvorrichtung verwendet wird, viermal spülen, wobei jeder Spülvorgang mit 300-350 µl Waschpuffer durchzuführen ist.) Die Platte nach dem letzten Spülvorgang – sowohl beim manuellen als auch beim automatisierten Verfahren – auf saugfähigen Tüchern ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
7. In jede Kavität 100 µl Konjugat geben.
8. 20 Minuten lang inkubieren.
9. Den Inhalt der Kavitäten aspirieren. Die Kavitäten mit 1fach konzentriertem Waschpuffer spülen, wie im vorhergehenden Schritt 6 beschrieben.
10. Die Platte nach dem letzten Spülvorgang auf saugfähigen Tüchern ausklopfen, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
11. In jede Kavität 100 µl Substrat geben.
12. 4 Minuten lang inkubieren. Zur Beachtung: Voraussetzung für eine optimale Assay-Leistung ist die präzise Zeiteinhaltung beim Inkubationsschritt für das Substrat. Die Zeitmessung sollte mit der Abgabe in die erste Kavität beginnen.
13. In jede Kavität 100 µl Stopplösung geben; dabei in der gleichen Reihenfolge vorgehen, wie bei der Substratabgabe im vorhergehenden Schritt. Sanft gegen die Platte klopfen, um den Inhalt der Kavitäten zu mischen. Die Dichtewerte innerhalb von 5 Minuten ablesen.
14. Die Dichte mit Hilfe eines ELISA-Plattenlesegeräts bei 450 nm und mit 650-nm-Referenzfilter messen. Falls das Lesegerät nicht über einen 650-nm-Filter verfügt, lassen sich vergleichbare Resultate auch mit einem alternativen 590-650-nm-Filter erzielen.

QUALITÄTSKONTROLLE:

1. Für einen gültigen Assay müssen die Kontrollwerte innerhalb der folgenden Bereiche liegen:
2. Negativer Kontroll-OD_{450-650 nm} muss <0,18 betragen.
3. Kalibrator-OD_{450-650 nm} muss <0,18 betragen.
4. Positiver Kontroll-OD_{450-650 nm} muss >1,2 betragen.
5. Sollte einer der OD_{450-650 nm}-Werte außerhalb der oben genannten Bereiche liegen, ist der Assay zu wiederholen.

BERECHNUNGEN:

1. Der Cutoff-Wert des Assays wird berechnet, indem dem OD-Wert des Kalibrators 0,3 hinzugerechnet werden.
2. Der Lyme-Indexwert (LI) jeder Patientenprobe wird berechnet, in dem der OD_{450-650nm}-Wert der Probe durch den Cutoff-Wert dividiert wird.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Lyme-Index

Interpretation

≤ 0,90

Negatives Ergebnis. Mit dem vorliegenden Assay waren keine Antikörper gegen C6-Peptid nachweisbar. Dieses Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *B. burgdorferi s.l.* nicht aus. In Fällen, in denen Verdacht auf eine Lyme-Borreliose im Frühstadium besteht, sollte daher nach 2-4 Wochen eine zweite Probe entnommen und ein erneuter Test durchgeführt werden.

0,91-1,09

Nicht eindeutiges Ergebnis. Die mit jeder Methode einhergehende spezifische Ungenauigkeit lässt auf einen geringeren Zuverlässigkeitsgrad bei der Interpretation von Proben schließen, deren OD_{450-650nm}-Werte sehr eng am berechneten Cutoff-Wert liegen. Aus diesem Grund wurde die Kategorie „nicht eindeutig“ eingerichtet. Proben mit nicht eindeutigen Ergebnissen sind erneut zu testen. Sollte das Ergebnis des erneuten Tests nicht eindeutig sein, ist eine neue Serumprobe zu entnehmen und zu testen.

≥ 1,10

Positives Ergebnis. Mit dem vorliegenden Assay waren Antikörper gegen C6-Peptid nachweisbar.

Der Cutoff-Wert jedes Assays wird berechnet, indem dem OD-Wert des Kalibrators 0,3 hinzugerechnet werden. Auf diese Weise soll der Cutoff-Wert Assay-Schwankungen von Lauf zu Lauf ausgleichen, die sich ansonsten auf die Empfindlichkeit und Genauigkeit auswirken könnten. Auslegungsgemäß ergibt der Kalibrator einen Dichtewert, der die Hintergrundreaktivität normaler Seren reflektiert.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Ein negatives Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *B. burgdorferi s.l.* nicht aus. Patienten im Frühstadium der Lyme-Borreliose und solche, die mit Antibiotika behandelt wurden, weisen möglicherweise keine nachweisbaren Antikörpertiter auf. Patienten mit einer klinischen Anamnese, Anzeichen oder Symptomen, die auf Lyme-Borreliose schließen lassen, sind nach 2-4 Wochen erneut zu testen, falls das anfängliche Testergebnis negativ ausfällt.
2. Ein positives Ergebnis ist kein definitiver Nachweis einer Infektion mit *B. burgdorferi s.l.*. Es ist möglich, dass andere Krankheitszustände beim Assay eine Artefaktreaktion auslösen.
3. Dieser Assay ist nicht für das Screening der Allgemeinbevölkerung vorgesehen. Die Vorhersagekraft des Assays ist eine Funktion der vor dem Test gegebenen Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lyme-Borreliose in der getesteten Population. Daher sollten ausschließlich Patienten mit klinischen Symptomen einer Lyme-Borreliose oder Verdacht auf *B. burgdorferi s.l.*-Exposition getestet werden.
4. Hämolytische, lipämische, bilirubinämische oder trübe Proben können zu artifiziellen Veränderungen der Assay-Ergebnisse führen. In diesen Fällen ist eine frische Probe für eine erneute Testdurchführung zu entnehmen.
5. Obwohl eine besondere Ausbildung ist nicht erforderlich, Voraussetzung für die optimale Leistung ist die strikte Einhaltung des in dieser Beilage beschriebenen Assay-Verfahrens. Ein von den Anweisungen abweichendes Vorgehen kann zu falschen Ergebnissen führen.
6. Die Seren von Patienten, die an anderen Krankheiten als Lyme-Borreliose leiden (u. a. an Syphilis, Parodontose, rheumatoider Arthritis, systemischem *Lupus erythematoses* und sonstigen Autoimmunerkrankungen oder Infektionskrankheiten) können falsch-positive Ergebnisse erbringen.

LEISTUNGSMERKMALE:

Die Leistung des C6 Lyme ELISA™-Kits wurde im Hinblick auf Nachweisgenauigkeit und -Empfindlichkeit mit der Leistung des vom CDC empfohlenen Two-Tier-Protokolls¹² (Proben mit positivem oder nicht eindeutigem ELISA-Ergebnis werden zur Ermittlung des endgültigen Ergebnisses mit IgG- und IgM-Western-Blot erneut getestet) verglichen.

GENAUIGKEIT:

Es wurden Serumproben von 1.842 regulären Blutspendern entnommen, was 1.329 Seren von Personen beinhaltete, die in Regionen mit Lyme-Borreliose-Endemie wohnten (Nordosten der USA) sowie 513 Seren von Personen, die in Gebieten wohnten, die als frei von Lyme-Borreliose-Endemie gelten (Südwesten der USA). Die Seren wurden mit dem C6 Lyme ELISA™-Kit getestet sowie mit dem Two-Tier-Protokoll, wobei beim ersten Schritt ein Ganzzell-Beschallungs-ELISA zum Einsatz kam (Tabelle 1). Die Genauigkeit des C6 Lyme ELISA™-Kits war der des Two-Tier-Protokolls statistisch gleichwertig, sowohl bei den gesunden Blutspendern aus Endemiegebieten als auch bei den gesunden Blutspendern aus Gebieten ohne Endemie ($p > 0,05$).

Siehe Anhang: Tabelle 1. Reaktivität bei Blutspendern aus Endemiegebieten und Gebieten ohne Endemie

EMPFINDLICHKEIT:

Insgesamt wurden 517 gut charakterisierte Serumproben von nordamerikanischen Patienten entnommen, bei denen auf Grund folgender Umstände eine Lyme-Borreliose diagnostiziert wurde: entweder (1) belegtes *Erythema migrans*, (2) für *B. burgdorferi* positive

Kultur oder positives PCR-Ergebnis oder (3) Lyme-Arthritis oder sonstige Symptome einer Ausbreitung der Lyme-Borreliose. Ein positives serologisches Ergebnis war kein Aufnahmekriterium für diese Gruppe.

Die Beurteilung des C6 Lyme ELISA™-Kits erfolgte im Vergleich zum Two-Tier-Protokoll bei der Patientengruppe mit Lyme-Borreliose. Insgesamt wies der C6 Lyme ELISA™ 74,9 % der Fälle von Lyme-Borreliose nach, im Vergleich zu 55,3 % positiven Befunden mit dem Two-Tier-Protokoll (Tabellen 2 und 3). Die Empfindlichkeit des C6 Lyme ELISA™ im Vergleich zum Two-Tier-Protokoll für den Nachweis von Lyme-Borreliose bei Patienten mit positiver Kultur ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Siehe Anhang: Tabelle 2. C6 Lyme ELISA™ im Vgl. zum Two-Tier-Protokoll

Siehe Anhang: Tabelle 3. Empfindlichkeit nach Probendefinitionskriterien

Außerdem wurde die Empfindlichkeit des C6 Lyme ELISA™-Kits beim Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* in Seren von Lyme-Borreliose-Patienten im Hinblick auf die Symptomkategorie untersucht. Einen Vergleich der Empfindlichkeit des C6 Lyme ELISA™ und des Two-Tier-Protokolls bietet Tabelle 4.

Siehe Anhang: Tabelle 4. Empfindlichkeit nach Symptomkategorie

Es wurden Proben von Lyme-Borreliose-Patienten nach der Zeitspanne ab dem Krankheitsbeginn eingeteilt und mit dem C6 Lyme ELISA™-Kit im Vergleich zum Two-Tier-Protokoll getestet (siehe Tabelle 5).

Siehe Anhang: Tabelle 5. Empfindlichkeit nach Zeitspanne ab Krankheitsbeginn

Die Analyse der Reaktivität in der Untergruppe der Lyme-Borreliose-Patienten mit positiven IgG- und IgM-Western-Blot-Ergebnissen zeigte, dass 100 % der Patienten mit positivem IgG-Western-Blot-Ergebnis (n=157) sowie 95,8 % der Patienten mit positivem IgM-Western-Blot-Ergebnis (n=192) sich auch mit dem C6 Lyme ELISA™ als positiv erwiesen (Tabelle 6). Dagegen erwiesen sich 47,5 % der Patienten mit positivem C6 Lyme ELISA™-Ergebnis (n=387) mit IgM-Western-Blot als positiv und 40,7 % (n=386) mit dem IgG-Western-Blot.

Siehe Anhang: Tabelle 6. C6 Lyme ELISA™-Ergebnisse im Vgl. zu Western-Blot-Ergebnissen

ERGEBNISSE DER PROSPEKTIVSTUDIE

Es wurde eine Prospektivstudie mit 1.276 Serumproben durchgeführt, die seriell in zwei Referenzlabors für Lyme-Borreliose-Screeningtests erhalten wurden. Die Seren wurden mit C6 Lyme ELISA™ und mit dem Two-Tier-Protokoll getestet (Tabelle 7). Bei 98,5 % der getesteten Proben zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse.

Siehe Anhang: Tabelle 7. Prospektivproben: C6 Lyme ELISA™-Ergebnisse im Vgl. zu Two-Tier-Ergebnissen

KREUZREAKTIVITÄT PRODUZIERENDE ZUSTÄNDE:

Seren von 366 Personen mit Krankheitszuständen, bei denen es sich nicht um Lyme-Borreliose handelte, wurden im Hinblick auf Kreuzreaktivität beim C6 Lyme ELISA™ getestet. Die Ergebnisse für siebzehn Krankheitszustände sind in Tabelle 8 aufgeführt. Zwei Seren erwiesen sich sowohl mit C6 ELISA als auch mit dem Two-Tier-Protokoll als positiv, während sich ein weiteres Serum nur mit dem Two-Tier-Protokoll als positiv erwies (Tabelle 9). C6 Lyme ELISA™ zeigte über alle Kategorien hinweg eine Gesamtgenauigkeit von 99,5 %.

Siehe Anhang: Tabelle 8. Kreuzreaktivität produzierende Zustände: C6 Lyme ELISA™-Ergebnisse

Siehe Anhang: Tabelle 9. Kreuzreaktivität produzierende Zustände: C6 Lyme ELISA™ im Vgl. zu Two-Tier-Protokoll

REPRODUZIERBARKEIT:

Die Reproduzierbarkeit wurde anhand eines aus 8 Proben bestehenden Profils getestet, darunter die positiven und negativen Kit-Kontrollen und 6 Proben, die 2 negative, 2 schwach reaktive und 2 positive Seren repräsentierten. Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden vier Analysen durchgeführt: Innerhalb eines Assays, zwischen Assays, zwischen Chargen und zwischen Standorten. Die Ergebnisse der einzelnen Analysen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Siehe Anhang: Tabelle 10. Reproduzierbarkeit: C6 Lyme ELISA™-Ergebnisse

KONTAKTINFORMATIONEN FÜR IMMUNETICS, INC.:

Immunetics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tel.: 800-227-4765 bzw. +1 617-896-9100
Fax: 617-896-9110
E-Mail: info@immunetics.com

AUTORISIERTE EUROPÄISCHE VERTRETUNG:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brüssel, Belgien
Tel.: (32) 2.732.59.54
Fax: (32) 2.732.60.03
E-Mail: mail@obelis.net



Immunitics® C6 Lyme ELISA™-kit
Katalognr.: DK-E601-096
96 test
Til *in vitro*-diagnostisk brug

RESUMÉ:

Lyme-sygdom er en multisystem infektionssygdom forårsaget af én af de tre spirochete *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2} genospecies, herunder *B. burgdorferi*, *B. garinii* og *B. afzelii*. Overførslen af sygdommen sker via bid fra én af de forskellige arter af *Ixodes*-flåter, som findes i USA³⁻⁵, Europa⁶, Rusland og andre lande i Asien.

Lyme-sygdom udvikler sig gennem flere stadier og producerer en række kliniske symptomer^{2,7}. Det første tegn på infektion (primært stadium) er udviklingen af et cirkelformet hududslæt, som kaldes 'erythema migrans' (EM), ved bidstedet. Dette opstår hos 60-80% af patienterne inden for nogle få dage eller uger efter infektionsstart; nogle patienter udvikler det ikke eller kan overse det. Almindelige influenzalignende symptomer (hovedpine, mavepine og træthed) ledsager eller følger ofte dette udslæt. Uger eller måneder senere udvikler sygdommen sig til andet stadium. Dette stadium kendetegnes sædvanligvis ved muskuloskeletale smerter eller ledbetændelse, neurologiske anomalier og/eller hjertekomplikationer. Kortvarige ledangreb, som påvirker større led, bliver efterhånden mere vedvarende og kan blive kroniske ved sen infektion (tredje stadium). Andre tegn på sent infektionsstadium inkluderer acrodermatitis chronica atrophicans, en hudlæsion, og forskellige neurologiske forstyrrelser forbundet med neuroborreliose.

Serologisk testning har vist sig at være nyttig til påvisning af antistofrespons over for *B. burgdorferi* som et supplement til diagnosticering. Hos de fleste Lyme-patienter kan der påvises en antistofrespons over for spirochete-antigener inden for nogle uger efter infektionen. Responsfølsomheden og -specificiteten samt tidsforløbet og antistoftypen varierer afhængigt af antigenet.

Antigenet, som anvendes i Immunitics® C6 Lyme ELISA™-kittet, er et syntetisk peptid (C6-peptid*) fra VlsE-proteinet, som har vist sig at være både specifik og yderst immunogen¹³⁻²⁰. Peptidsekvensen bevares og er ligeledes antigen hos mennesker inficeret med *borrelia burgdorferi sensu stricto* eller med europæiske genospecies, herunder *borrelia afzelii* og *borrelia garinii*⁶. Da antigenet repræsenterer en defineret sekvens i proteinet, reduceres den potentielle krydsreaktivitet med ikke-relaterede og delvist relaterede antigener fundet i andre organismer i betydelig grad.

*Amerikanske (USA) patenter 6,475,492, 6,719,983 og 6,740,744 samt internationale patenter.

PRINCIP:

Immunitics® C6 Lyme ELISA™-kittet er baseret på et syntetisk peptidantigen (C6-peptid) i MicroWell Elisa-format. I analyseproceduren tilføres fortyndede serumprøver til og inkuberes i brønde med en antigenbelagt MicroWell-plade. Antistoffer for C6-peptidet i serumprøven bindes af det immobiliserede antigen, og ubundne antistoffer fjernes under vasketrinene. De bundne antistoffer påvises ved at tilføje et peberrodsperoxidase (HRP)-konjugeret gede anti-humant IgG/IgM-konjugat. Efter fjernelse af overskydende konjugat under de yderligere vasketrin tilføres der et kromogent peroxidasesubstrat indeholdende tetramethylbenziden (TMB). Der produceres et blågrønt produkt i brønde, hvor antistoffer er bundet til antigenet. Farveudviklingsreaktionen undertrykkes ved tilførsel af fortyndet diethylsyre og producerer en gul farveforandring, hvorefter der måles en optisk absorbans ved 450 nm, der korrigeres af en 590 - 650 nm baggrundssubtraktion, i hver brønd ved brug af en ELISA-mikroplade aflæser.

LEVEREDE REAGENSER:

1. MicroWell-plade (komponentnr. CB-P005-096). 96 brønde, der leveres i tolv strimler med 8 brønde hver og opbevares i en genlukkelig foliepose med tørremiddel.
2. Positiv kontrolopløsning (0,300 ml) (komponentnr. CB-L018-300). Humant kildemateriale med gentamicin og ProClin tilført som konserveringsmidler.
3. Negativ kontrolopløsning (0,300 ml) (komponentnr. CB-N023-300). Humant kildemateriale med gentamicin og ProClin tilført som konserveringsmidler.
4. Cutoff-kalibrator (0,300 ml) (komponentnr. CB-N030-300). Humant kildemateriale med gentamicin og ProClin tilført som konserveringsmidler. Anvendes til at kalibrere analysens cutoff-værdi.
5. Konjugat (15 ml) (komponentnr. CB-A028-015). Klar til at anvende gede anti-humant IgG/IgM peberrodsperoxidase konjugat.
6. Prøvefortynder (30 ml) (komponentnr. CC-S004-030). Klar til brug af fortyndingsbuffer indeholdende gentamicin og ProClin som konserveringsmidler.
7. TMB ELISA-substrat (15 ml) (komponentnr. CC-S003-015). Klar til brug af opløsning indeholdende hydrogenperoxid og TMB.
8. 10X vaskebufferkoncentrat (60 ml) (komponentnr. CC-B001-060). Indeholder fosfatbufferet saltopløsning og Tween-20 rensmiddel med ProClin tilført som konserveringsmiddel.
9. Stopopløsning (15 ml) (komponentnr. CC-S005-015). Klar til brug af sur opløsning.

FORHOLDSREGLER:

1. De humane kildematerialer, som anvendes i dette kit, er testet negative vha. FDA-godkendte metoder for antistoffer for HIV-1 og HIV-2, Hepatitis C og Hepatitis B overfladeantigen. Men da ingen testmetoder kan give fuld sikkerhed for, at disse infektiøse agenser er fraværende, skal alle kontrolopløsninger og testprøver håndteres, som var de i stand til at overføre infektiøse agenser. De skal betragtes som potentielt infektiøse materialer og håndteres på biosikkerhedsniveau 2 som anbefalet i vejledningen fra CDC/National Institutes of Health (centre for sygdomskontrol/nationale sundhedsinstitutioner), "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition", 1999.
2. Bær egnet personligt sikkerhedsudstyr under udførelsen af analysen. Lad ikke reagenser komme i kontakt med hud, øjne eller mund, da det kan forårsage irritation. Skyl grundigt efter med vand i tilfælde af kontakt. Anvend ikke mundpipetter til overførsel af reagenser.
3. Luk hættten til på kontrolopløsninger og kalibratoren efter brug for at mindske fordampning.
4. Stopopløsning indeholder diethylsyre. Affald, der indeholder stopopløsning, skal have en neutral pH-værdi inden bortskaffelse. Forsigtig: Tilførsel af natriumhypochlorit (blegemiddel) til opløsninger, der indeholder diethylsyre, producerer toksisk klorgas.
5. Brug nye pipettespidser til pipettering af hver enkelt prøve og reagens. Genbrug af pipettespidser kan medføre forurening.
6. Kassér brugte analysereagenser og -prøver iht. de anerkendte procedurer for biologisk affald.
7. Bland ikke reagenser fra kit med forskellige partinumre. Anvend ikke kittets komponenter efter udløbsdatoen på etiketten.
8. Alle komponenter i kittet skal opnå stuetemperatur (19 – 26°C), inden analysen startes.
9. TMB ELISA-substrat er følsomt over for lys og metalioner. Undgå eksponering over for lys og metalioner.
10. Anvend kun destilleret eller demineraliseret vand til klargøring af buffere i analysen.
11. Bær handsker under håndtering af MicroWell-pladestrimler.
12. Følg instruktionerne i indlægssedlen for således at opnå en optimal, reproducerbar og nøjagtig testydelse. Afvigelser fra instruktionerne i denne indlægsseddel kan medføre ukorrekte resultater.
13. Forvask ikke brøndene med vaskebuffer eller prøvefortynder.
14. Bland ikke glashætterne fra TMB ELISA-substrat og konjugatet sammen.

IKKE MEDLEVERET, PÅKRÆVET MATERIALE:

1. Graderede cylindre til måling af væske
2. 1-liters flaske til vaskebuffer
3. Pipetter til dispensering af 10µL til 200µL (pipetter med flere kanaler anbefales eller 10µL, 100µL og 200µL pipetter)
4. MicroWell-plade uden belægning eller reagensglas til prøvefortynding
5. Destilleret eller demineraliseret vand
6. Timer (0 – 60 minutter)
7. ELISA-aflæser med 450 nm filter og et 590 – 650 nm referencefilter
8. Vakuumaspirator eller kasseringsanordning til analyseopløsninger (aspirator med flere kanaler anbefales)
9. Absorberende servietter
10. Centrifuge med 10 000 o/m

VALGFRIT UDSTYR:

1. Automatisk pladevasker

REAGENSERNES OPBEVARING OG HOLDBARHED:

1. Opbevar det uåbnede kit ved temperaturer mellem 2 – 8° C. Udløbsdatoen fremgår af kittets etiket.
2. Ubrugte mikropaladestrimler skal opbevares ved mellem 2 – 8° C forseglet i den originale foliepose med tørremiddel.
3. Kitkomponenterne, herunder kontrolopløsninger, kalibrator, HRP-konjugat, substrat, stopopløsning, prøvefortynder og 10X vaskebufferkoncentrat, skal opbevares ved mellem 2 – 8° C.
4. 1X (fungerende) vaskebufferopløsning kan opbevares ved stuetemperatur (19 – 26°C) i op til 30 dage.
5. TMB ELISA-substrat skal opbevares i lysbeskyttende flasker, der ikke indeholder metalioner. Substratets holdbarhed er baseret på opbevaring i den ravfarvede plasticflaske, som leveres med kittet.
6. Anvend ikke kittets komponenter efter udløbsdatoen.

PRØVEOPSAMLING:

1. Friske humane serumprøver skal opsamles og opbevares ved mellem 2 – 8° C, hvis testning foretages inden for 10 dage, eller nedfryses.
2. Hæmolysert eller lipemisk serum samt serum udsat for flere fryse-tø-cykler kan give anormale resultater.
3. Centrifuger serum i 1 minut ved 10 000 o/m i en mikrocentrifuge for at fjerne synligt præcipitat inden testning.
4. Test ikke prøver, der viser tegn på mikrobiel forurening.
5. Analysen er beregnet til brug med humant serum. Brugen af plasma med denne analyse er ikke fastsat.

KLARGØRING AF REAGENS, KONTROLOPLØSNING, KALIBRATOR OG PRØVE:

1. 1X vaskebuffer: Til klargøring én gang tilføres 60 ml 10X vaskebufferkoncentrat til 540 ml demineraliseret/destilleret vand i en 1-liters flaske og omrør grundigt. **Bemærk:** Når 10X vaskebufferkoncentratet tages ud fra køl, kan uopløste salte være til stede. Lad reagensen nå stuetemperatur og ryst flasken for at opløse saltene.

- Kontrolopløsninger og kalibrator: Centrifuger kontrolopløsninger og kalibrator ved $10\,000 \times g$ i 10 sekunder inden de bruges for at bundfælde al væske i bunden af glasset. (Forud for udlevering, hvis Controls er bemærket at være for uklar, har beviser for koagulation eller er vanskelige at pipette centrifuge en anden gang i 1 minut ved 10.000 rpm.) Dispensér 200µL prøvfortynder i 3 rene reagensglas eller mikropladebrønde uden belægning. Tilfør 10µL negativ kontrolopløsning til ét glas eller brønd, tilfør 10µL positiv kontrolopløsning til et andet glas eller brønd, tilfør 10µL kalibrator til et tredje glas eller brønd og bland grundigt.
- Patientprøver: Dispensér 200µL prøvfortynder i hvert enkelt reagensglas eller mikropladebrønd uden belægning i en serie, som er nok til antallet af prøver, der skal testes. Tilfør 10µL fra hver prøve til det tilhørende glas eller brønd og bland grundigt.

ANALYSEPROCEDURE:

Lad alle analysereagenser opnå stuetemperatur (19 – 26°C) inden analysen startes. Alle trin skal udføres ved stuetemperatur (19 – 26°C).

- Notér prøveidentiteten ned for hver brønd på det medleverede registreringsark for at fastlægge det antal strimler, som er nødvendige for at udføre analysen. Tre brønde er nødvendige til kontrolopløsninger og kalibrator. Én brønd er nødvendig til hver prøve.
- Tag mikropladens ramme af, som indeholder mikropladestrimlerne fra folieposen. Fjern unødige mikropladestrimler fra rammen og læg ubrugte strimler i folieposen med tørremiddel igen og luk posen til. Mikropladens ramme skal bevares til afslutningen af analysen til brug sammen med de resterende mikropladestrimler.
- Tilfør 100µL fortyndet positiv kontrolopløsning i én MicroWell-brønd, 100µL fortyndet negativ kontrolopløsning i en anden MicroWell-brønd og 100µL fortyndet kalibrator i en tredje MicroWell-brønd.
- Tilfør 100µL fra hver enkelt fortyndede patientprøve i MicroWell-brøndene.
- Inkubér i 30 minutter.
- Foretag aspiration af brøndene. Vask tre gange på følgende måde, hvis der bruges manuel eller halvautomatisk vaskemanifold. Dispensér cirka 300µL 1X vaskebuffer i hver brønd og foretag derefter aspiration. Fyld brøndene op igen med cirka 300µL 1X vaskebuffer og foretag aspiration endnu en gang. Fyld brøndene op igen med cirka 300µL 1X vaskebuffer og foretag aspiration en tredje gang. Kontrollér, at der er foretaget aspiration af alle brønde efter det tredje (afsluttende) vasketrin. (Hvis der anvendes en automatisk pladevasker, skal der vaskes fire gange med hver vask bestående af 300-350µL 1X vaskebuffer). Bank pladen af på absorberende servietter for at fjerne al restvæske efter den afsluttende vask, både ifm. manuel og automatisk vask.
- Dispensér 100µL konjugat i hver brønd.
- Inkubér i 20 minutter.
- Foretag aspiration af brøndene. Vask brøndene med 1X vaskebuffer som i trin 6 ovenfor.
- Bank pladen af på absorberende servietter for at fjerne al restvæske efter den afsluttende vask.
- Dispensér 100µL substrat i hver brønd.
- Inkubér i 4 minutter. Bemærk: Optimal analyseydelse kræver nøjagtig timing af substratets inkubationstrin. Timing skal måles fra tilførslen i den første brønd.
- Dispensér 100µL stopopløsning i hver brønd i samme rækkefølge som substratet blev dispenseret i foregående trin. Bank let på pladen for at blande indholdet i brøndene. Aflæs absorbansværdierne inden for 5 minutter.
- Aflæs absorbans ved 450 nm med et referencefilter på 650 nm vha. en ELISA-pladeaflæser. Hvis aflæseren ikke er udstyret med et 650 nm filter, vil brugen af et tilsvarende filter på mellem 590 – 650 nm give tilsvarende resultater.

KVALITETSKONTROL:

- Kontrolværdierne skal ligge inden for følgende områder, for at analysen kan betragtes som gyldig:
- Negativ kontrolopløsning $A_{450-650nm}$ skal være $<0,18$.
- Kalibrator $A_{450-650nm}$ skal være $<0,18$.
- Positiv kontrolopløsning $A_{450-650nm}$ skal være $>1,2$.
- Hvis én af $A_{450-650nm}$ kontrolværdierne ikke ligger inden for ovennævnte områder, skal analysen gentages.

BEREGNINGER:

- Beregn analysens cutoff-værdi ved at lægge 0,3 til kalibratorens absorbansværdi.
- Beregn Lyme-indeksværdien (LI) for hver patientprøve ved at dividere prøvens $A_{450-650nm}$ med cutoff-værdien.

FORTOLKNING AF RESULTATERNE:

| Lyme-indeks | Fortolkning |
|-------------|--|
| $\leq 0,90$ | Negativt resultat. Der er ikke påvist antistoffer mod C6-peptidet i den aktuelle analyse. Dette resultat udelukker ikke muligheden for infektion med <i>B. burgdorferi s.l.</i> , og hvor der er mistanke om tidlig Lyme-sygdom, skal der tages en ny prøve 2 – 4 uger senere, og testen skal foretages igen. |
| 0,91 – 1,09 | Tvivlsomt resultat. Den unøjagtighed, som er uløseligt forbundet med alle metoder, medfører en lavere grad af tillid til fortolkningen af prøverne med $A_{450-650nm}$ værdier, som ligger tæt på den beregnede cutoff-værdi. Af denne årsag har man dannet en kategori for tvivlsomme resultater. Prøver, der har givet tvivlsomme resultater, skal testes igen. Hvis den sekundære test giver et tvivlsomt resultat, skal der tages en ny serumprøve til en ny test. |

≥ 1,10

Positivt resultat. Der er påvist antistoffer mod C6-peptidet i den aktuelle analyse.

Cutoff-værdien bestemmes for alle udførte analyser ved at lægge 0,3 til kalibratorens absorbansværdi. Således er cutoff-værdien beregnet til at kompensere for variationer fra analyse til analyse, som ellers ville påvirke følsomheden og specificiteten. Kalibratoren er udformet til at give en absorbansværdi, der afspejler baggrundsreaktiviteten i normalt serum.

BEGRÆNSNINGER:

1. Et negativt resultat udelukker ikke muligheden for infektion med *B. burgdorferi* s.l. Patienter i tidlige stadier af Lyme-sygdommen, og personer, som er blevet behandlet med antibiotika, udviser muligvis ikke påviselige antistofniveauer. Patienter med klinisk historie, tegn eller symptomer, der tyder på Lyme-sygdom, skal testes igen efter 2-4 uger, hvis det første testresultat er negativt.
2. Et positivt resultat er ikke et sikkert bevis på infektion med *B. burgdorferi* s.l. Det er muligt, at andre sygdomstilstande kan producere artifaktuel reaktivitet i analysen.
3. Denne analyse bør ikke anvendes til screening af den generelle population. Analysens prognoseværdi er en funktion af prætest sandsynligheden for Lyme-sygdom i den testede population. Derfor er det kun patienter med kliniske symptomer på Lyme-sygdom eller patienter, hvor der foreligger mistanke om, at de har været eksponeret for *B. burgdorferi* s.l., der bør testes.
4. Prøver, som er hæmolyserede, lipemiske, indeholder bilirubin eller er uklare, kan producere artifaktuelle analyseresultater. Der bør tages en frisk prøve mhp. at foretage en ny test.
5. Selvom særlig uddannelse ikke er nødvendig, en optimal ydelse kræver, at analyseproceduren beskrevet i denne indlægsseddel følges til punkt og prikke. Afvigelser fra proceduren kan medføre afvigende resultater.
6. Falske positive resultater kan fås med sera fra patienter, der lider af andre sygdomme end Lyme-sygdom, herunder syfilis, periodontal sygdom, reumatoid arthrit, systemisk lupus erythematosus og andre autoimmune eller infektiøse sygdomme.

YDELSESKARAKTERISTIKA:

C6 Lyme ELISA™-kittets ydelse blev sammenlignet med ydelsen i totrins protokollen anbefalet af CDC (centrene for sygdomskontrol)¹² (positive eller tvivlsomme prøver udført med ELISA testes igen med IgG og IgM Western Blot for at bestemme det endelige resultat) med hensyn til påvisningens specificitet og følsomhed.

SPECIFICITET:

Der blev taget serumprøver fra 1 842 normale bloddonorer bestående af 1 329 sera fra individer bosiddende i endemiske områder for Lyme-sygdom (nordøstlige USA) og 513 sera fra individer bosiddende i områder, der ikke betragtes som værende endemiske for Lyme-sygdom (sydvestlige USA). Sera blev testet med C6 Lyme ELISA™-kittet og totrins protokollen ved brug af en helcelle sonikat ELISA i første trin (tabel 1). C6 Lyme ELISA™-kittets specificitet svarede statistisk set til totrins protokolens specificitet, både hvad angik endemiske og ikke-endemiske, raske bloddonorer ($p > 0,05$).

Se Tillæg: Tabel 1. Reaktivitet hos endemiske og ikke-endemiske bloddonorer

FØLSOMHED:

Der blev taget i alt 517 velkarakteriserede serumprøver fra nordamerikanske patienter, som var blevet diagnosticeret med Lyme-sygdom baseret på enten (1) dokumenteret erythema migrans, (2) kultur eller PCR-positiv for *B. burgdorferi* eller (3) Lyme-arthrit eller andre symptomer på dissemineret Lyme-sygdom. Positiv serologi var ikke et kriterie for inkludering i denne gruppe.

C6 Lyme ELISA™-kittet blev evalueret i sammenligning med totrins protokollen i Lyme-patientgruppen. Samlet påviste C6 Lyme ELISA™ 74,9% af Lyme-patienterne sammenlignet med 55,3%, der fandtes positive vha. totrins protokollen (tabel 2 og 3). Følsomheden af C6 Lyme ELISA™ versus totrins protokollen til påvisning af Lyme-patienter med positiv kultur vises i tabel 3.

Se Tillæg: Tabel 2. C6 Lyme ELISA™ versus totrins protokol

Se Tillæg: Tabel 3. Følsomhed baseret på prøvedefinitionskriterie

C6 Lyme ELISA™-kittets følsomhed ifm. påvisning af antistoffer mod *B. burgdorferi* i Lyme-patienters sera blev også evalueret mht. symptomkategori. En sammenligning af følsomheden mellem C6 Lyme ELISA™ og totrins protokollen vises i tabel 4.

Se Tillæg: Tabel 4. Følsomhed baseret på symptomkategori

Prøver fra Lyme-patienter stratificeret over tid efter sygdommens start blev testet med C6 Lyme ELISA™-kittet versus totrins protokollen som vist i tabel 5.

Se Tillæg: Tabel 5. Følsomhed over tid efter sygdomsstart

En analyse af reaktiviteten i undersættet af IgG og IgM Western Blot-positive Lyme-patienter viste, at 100% af patienterne med positiv IgG Western Blot ($n=157$) og 95,8% af patienterne med positiv IgM Western Blot ($n=192$) var også positive med C6 Lyme

ELISA™ (tabel 6). Omvendt var 47,5% af de positive patienter med C6 Lyme ELISA™ (n=387) positive med IgM Western Blot, og 40,7% (n=386) var positive med IgG Western Blot.

Se Tillæg: Tabel 6. Resultater for C6 Lyme ELISA™ versus Western Blot

PROSPEKTIVE UNDERSØGELSESRISULTATER:

Der blev udført en prospektiv undersøgelse af 1 276 serumprøver modtaget fortløbende på to referencelaboratorier til udførelse af Lyme-screeningstest. Sera blev testet med C6 Lyme ELISA™ og med totrins protokollen (tabel 7). Samstemmende resultater blev fundet i 98,5% af de testede prøver.

Se Tillæg: Tabel 7. Prospektive prøver: Resultater med C6 Lyme ELISA™ versus totrins protokollen

KRYDSREAKTIVE TILSTANDE:

Sera fra 366 individer med andre sygdomstilstande end Lyme-sygdom blev testet for krydsreaktivitet med C6 Lyme ELISA™. Resultaterne for sytten tilstande vises i tabel 8. To sera blev fundet positive med både C6 ELISA og totrins protokollen, og ét serum testede positivt kun med totrins protokollen (tabel 9). C6 Lyme ELISA™ viste en overordnet specificitet på 99,5% i alle kategorier.

Se Tillæg: Tabel 8. Krydsreaktive tilstande: Resultater med C6 Lyme ELISA™

Se Tillæg: Tabel 9. Krydsreaktive tilstande: C6 Lyme ELISA™ versus totrins protokollen

REPRODUCERBARHED:

Reproducerbarheden blev testet på et panel af 8 prøver, herunder kittets positive og negative kontrolopløsninger samt 6 prøver, der repræsenterede 2 negative, 2 ugentlige reaktive og 2 positive sera. Reproducerbarheden blev vurderet i fire analyser: intra-analyse, inter-analyse, inter-lot, og inter-site. Resultaterne fra hver af disse analyser resumeres i følgende tabel.

Se Tillæg: Tabel 10. Reproducerbarhed: Resultater fra C6 Lyme ELISA™

IMMUNETICS, INC. KONTAKTINFORMATION:

Immunitics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tlf.: 800-227-4765 eller (+1) 617-896-9100
Fax: (+1) 617-896-9110
E-mail: info@immunitics.com

AUTORISERET REPRÆSENTANT I EUROPA:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Bruxelles, BELGIEN
Tlf.: (+32) 2.732.59.54
Fax: (+32) 2.732.60.03
E-mail: mail@obelis.net



Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit
Cat. Nr.: DK-E601-096
96 Testen
Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

SAMENVATTING:

De ziekte van Lyme is een multisysteemziekte die wordt veroorzaakt door infectie met een van de drie genospecies van de spirocheet *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2}, waaronder *B. burgdorferi*, *B. garinii*, en *B. afzelii*. De ziekte wordt overgedragen door de bijt van een van de verschillende soorten *Ixodes* teken, die in de Verenigde Staten³⁻⁵, Europa⁶, Rusland, en andere landen in Azië worden gevonden.

De verschillende stadia van de ziekte van Lyme gaan gepaard met een matrix van klinische symptomen^{2,7}. Het eerste teken van infectie (primair stadium) is de ontwikkeling van een cirkelvormige huiduitslag, aangeduid met 'erythema migrans' (EM) op de bijtplek. Dit komt voor bij 60-80% van de patiënten binnen enkele dagen of weken na de initiële infectie; sommige patiënten vertonen deze ontwikkeling niet of kijken er overheen. Algemene griepachtige symptomen (hoofdpijn, buikpijn, en moeheid) gaan vaak gepaard met deze uitslag of doen zich daarna voor. Weken tot maanden later ontwikkelt de ziekte zich verder tot een secundair stadium. Dit stadium wordt vaak gekenmerkt door pijnlijke skeletspieren of artritis, neurologische abnormaliteiten en/of hartcomplicaties. Korte artritisaanvallen die de grote gewrichten treffen, worden na verloop van tijd hardnekkiger en kunnen zich ontwikkelen tot een chronische aandoening in late infectie (tertiair stadium). Andere manifestaties van de infectie in het late stadium omvatten Acrodermatitis Chronicum Atrophicum, een huidlaesie, en verschillende neurologische afwijkingen die in verband worden gebracht met met neuroborreliose.

Serologische testen hebben hun nut bewezen bij het detecteren van de antilichaamreactie op *B. burgdorferi* als een aanvulling op diagnose. In de meeste Lyme-patiënten kan weken na de infectie een antilichaamreactie op spirochete antigenen worden gedetecteerd. De gevoeligheid en specificiteit van de reactie alsook het tijdsverloop en de antilichaamklasse variëren afhankelijk van het antigeen.

Het antigeen dat in de Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit wordt gebruikt, een synthetisch peptide (C6-peptide*) dat is afgeleid van het VlsE-eiwit, blijkt zowel specifiek alsook zeer immunogeen te zijn¹³⁻²⁰. De peptidensequentie is geconserveerd en op vergelijkbare wijze antigeen in mensen die zijn geïnfecteerd met *Borrelia burgdorferi sensu stricto* of met Europese genospecies waaronder *Borrelia afzelii* en *Borrelia garinii*⁶. Omdat het antigeen een gedefinieerde sequentie in het eiwit vertegenwoordigt, is potentiële kruisreactiviteit met niet verwante en gedeeltelijk verwante antigenen die in andere organismen worden gevonden enorm gereduceerd.

*U.S. Octrooien 6,475,492, 6,719,983, en 6,740,744 en internationale octrooien.

PRINCIPE:

De Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit is gebaseerd op een synthetisch peptide-antigen (C6-peptide) in microputjes-ELISA-format. In de assayprocedure worden verdunde serummonsters aan de putjes van een met antigen bedekte microtiterplaat toegevoegd en daarin geïncubeerd. Antilichamen in het serummonster die specifiek zijn voor het C6-peptide worden door het geïmmobiliseerde antigen gebonden en ongebonden antilichamen worden door de wasstappen verwijderd. De gebonden antilichamen worden door de toevoeging van een met mierikswortelperoxidase geconjugeerd (HRP) geit-anti-menselijk-IgG/IgM-conjugaat gedetecteerd. Na verwijdering van de overmaat aan conjugaat door verdere wasstappen, wordt een chromogeen peroxidasesubstraat bevattende tetramethylbenzidine (TMB) toegevoegd. In de putjes waar antilichamen aan het antigeen zijn gebonden wordt een blauwgroen product geproduceerd. De kleurontwikkelingsreactie wordt door de toevoeging van verdund zwavelzuur gedoofd, waardoor een gele kleurverandering plaats vindt, waarna in elk putje met behulp van een ELISA-microtiterplaatlezer de optische absorptie bij 450 nm, gecorrigeerd door het aftrekken van een achtergrond van 590-650 nm, wordt gemeten.

VERSTREKTE REAGENTIE:

1. Microtiterplaat (Deel # CB-P005-096). 96 putjes, verstrekt in twaalf strips van elk 8 putjes en bewaard in een herafsluitbaar foliezakje met droogmiddel.
2. Positieve controle (0,300 ml) (Deel # CB-L018-300). Menselijk bronmateriaal waarbij als conserveermiddelen Gentamicine en ProClin zijn toegevoegd.
3. Negatieve controle (0,300 ml) (Deel # CB-NO23-300). Menselijk bronmateriaal waarbij als conserveermiddelen Gentamicine en ProClin zijn toegevoegd.
4. Calibrator voor uitsluitingswaarde (0,300 ml) (Deel # CB-N030-300). Menselijk bronmateriaal waarbij als conserveermiddelen Gentamicine en ProClin zijn toegevoegd. Deze wordt gebruikt om de uitsluitingswaarden van de assay te kalibreren.
5. Conjugaat (15 ml) (Deel # CB-A028-015). Geit-anti-menselijk-IgG/IgM-mierikswortelperoxidaseconjugaat dat klaar is voor gebruik.

6. Monsterverdunningsmiddel (30 ml) (Deel # CC-S004-030). Verdunningsbuffer met als conserveermiddelen Gentamicine en ProClin die klaar is voor gebruik.
7. TMB-ELISA-substraat (15 ml) (Deel # CC-S003-015). Oplossing bevattende waterstofperoxide en TMB die klaar is voor gebruik.
8. 10 x wasbufferconcentraat (60 ml) (Deel # CC-B001-060). Bevat fosfaatgebufferde zoutoplossing en Tween-20 detergens, waarbij als een conserveermiddel ProClin is toegevoegd.
9. Stopoplossing (15 ml) (Deel # CC-S005-015). Zure oplossing die klaar is voor gebruik.

VOORZORGSMAATREGELEN:

1. De menselijke bronmaterialen die in deze kit worden gebruikt zijn door FDA goedgekeurde methoden negatief getest op antilichamen tegen HIV-1 en HIV-2, en oppervlakte-antigenen van Hepatitis C en Hepatitis B. Omdat geen enkele testmethode volledige garantie kan geven dat deze infectieuze middelen afwezig zijn, moeten alle controles en testmonsters echter worden behandeld als zouden ze in staat zijn om infectieuze middelen over te dragen. Ze moeten als potentieel infectieuze materialen worden beschouwd en worden behandeld op het Biosafety niveau 2 zoals aanbevolen in de handleiding van CDC/National Institutes of Health (CDC/Nationale instituten voor de gezondheid) "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th Edition", 1999.
2. Draag de juiste persoonlijke bescherming bij het uitvoeren van de assay. Zorg ervoor dat de reagentia niet in contact kunnen komen met de huid, ogen of mond, omdat dit irritatie kan veroorzaken. Was elke keer dat u met reagentia in contact bent geweest grondig met water. Pipetteer de reagentia niet met de mond.
3. Sluit de controles en calibrator na gebruik goed af om verdamping te minimaliseren.
4. Stopoplossing bevat zwavelzuur. Afval met stopoplossing moet voor verwijdering tot neutrale pH worden gebracht. Waarschuwing: De toevoeging van natriumhypochloriet (bleek) aan oplossingen die zwavelzuur bevatten zal toxisch chloorgas produceren.
5. Gebruik voor het pipetteren van elk monster en reagens verse pipettips. Hergebruik van pipettips kan verontreiniging introduceren.
6. Verwijder gebruikte assayreagentia en monsters door de juiste procedures voor kunnen gevaarlijk materiaal.
7. Meng geen reagentia van kits met verschillende partijnummers. Gebruik geen kitcomponenten na de houdbaarheidsdatum op het label.
8. Voor het begin van de assay moeten alle kitcomponenten tot kamertemperatuur (19 – 26 °C) worden gebracht.
9. TMB-ELISA-substraat is gevoelig voor licht en metaalionen. Vermijd blootstelling aan licht en metaalionen.
10. Gebruik voor het bereiden van buffers in de assay alleen gedistilleerd of gedeïoniseerd water.
11. Draag handschoenen wanneer microtiterplaatstrips worden behandeld.
12. Volg de instructies in de bijsluiters voor optimale, reproduceerbare en nauwkeurige werking van de test. Afwijkingen van de instructies in deze bijsluiters kunnen tot valse resultaten leiden.
13. Was de putjes niet vooraf met wasbuffer of monsterverdunningsmiddel.
14. Verwissel de doppen van de flessen van TMB-ELISA-substraat en conjugaat niet.

MATERIALEN DIE ZIJN VEREIST MAAR NIET WORDEN VERSTREKT:

1. Maatcilinders voor het meten van vloeistof
2. 1 liter fles voor wasbuffer
3. Pipetten voor het toevoegen van 10 µl tot 200 µl (multikanaalpipet of 10 µl, 100 µl en 200 µl pipetten worden aanbevolen)
4. Onbedekte microtiterplaat of testbuizen voor monsterverdunning
5. Gedistilleerd of gedeïoniseerd water
6. Timer (0 – 60 minuten)
7. ELISA-lezer met filter van 450 nm en een referentiefilter van 590 – 650 nm
8. Vacuümafzuiger of afvoermiddelen voor assay-oplossingen (afzuiger met meerdere kanalen wordt aanbevolen)
9. Absorberende doeken
10. Centrifuge die tot 10 000 rpm kan centrifugeren

OPTIMALE UITRUSTING:

1. Geautomatiseerde plaatwasser

BEWARING EN HOUDBAARHEID VAN REAGENTIA

1. Bewaar ongeopende kit bij 2 – 8 °C. Uiterste houdbaarheidsdatum wordt op het kitlabel weergegeven.
2. Ongebruikte microtiterplaatstrips moeten afgesloten in het oorspronkelijke foliezakje met droogmiddel bij 2 – 8 °C worden bewaard.
3. Kitcomponenten waaronder controles, calibrator, HRP-conjugaat, substraat, stopoplossing, monsterverdunningsmiddel, en 10 x wasbufferconcentraat moeten bij 2 – 8 °C worden bewaard.
4. 1 x (werkende) wasbuffer oplossing kan tot 30 dagen bij kamertemperatuur (19 – 26 °C) worden bewaard.
5. TMB-ELISA-substraat moet in lichtbeschermende flessen zonder metaalionen worden bewaard. De houdbaarheidsperiode van het substraat is gebaseerd op bewaring in de plastic amber fles die bij de kit wordt verstrekt.
6. Gebruik kitcomponenten niet later dan de uiterste houdbaarheidsdatum.

VERZAMELING VAN MONSTERS:

1. Verse menselijke serummonsters moeten worden verzameld en ofwel bij 2 – 8 °C worden bewaard als ze binnen 10 dagen worden getest, ofwel ingevroren.
2. Gehemolyseerde of lipemische sera, en sera die meerdere cycli van invriezen en ontdooien hebben ondergaan, kunnen afwijkende resultaten opleveren.
3. Centrifugeer de sera vóór het testen gedurende 1 minuut bij 10 000 rpm in een microcentrifuge om elk zichtbaar precipitaat te verwijderen.
4. Test geen monsters die aantoonbaar microbiële verontreiniging omvatten.
5. Assay is bedoeld voor gebruik met menselijk serum. Deze assay is niet erkend voor het gebruik met plasma.

REAGENS, CONTROLE, CALIBRATOR EN MONSTERBEREIDING:

1. 1 x wasbuffer: Voeg voor eenmalige bereiding 60 ml 10 x wasbufferconcentraat toe aan 540 ml gedeioniseerd/gedistilleerd water in een fles van 1 liter en roer grondig. **Let op:** Wanneer het 10 x wasbufferconcentraat uit de koeling wordt gehaald, kunnen daarin niet-opgeloste zouten aanwezig zijn. Laat het reagens op kamertemperatuur komen en schud de fles voor het oplossen van de zouten.
2. Controles en calibrator: Centrifugeer controles en calibrator voor gebruik bij 10 000 × g gedurende 10 seconden om alle vloeistof naar de bodem van de buis te brengen. (Vóór uitlevering, indien controles worden opgemerkt vloeistof erg troebel te zijn, het bewijs van stolling hebben of zijn moeilijk te pipet, centrifuge een tweede keer gedurende 1 minuut bij 10.000 rpm.) Pipetteer 200 µl monsterverdunningsmiddel in 3 schone testbuizen of putjes van een onbedekte microtiterplaat. Voeg 10 µl negatieve controle toe aan een buis of putje; voeg 10 µl positieve controle toe aan een andere buis of putje; voeg 10 µl calibrator toe aan een derde buis of putje en meng grondig.
3. Patiëntenmonsters: Pipetteer in elk van een serie van buizen of putjes van een onbedekte microtiterplaat 200 µl monsterverdunningsmiddel, voldoende voor het aantal monsters dat getest dient te worden. Voeg 10 µl van elk monster aan de overeenkomende buis of het overeenkomende putje toe en meng grondig.

ASSAYPROCEDURE:

Breng alle assayreagentia op kamertemperatuur (19 – 26 °C) voordat er met de assay wordt begonnen. Alle stappen worden bij kamertemperatuur (19 – 26 °C) uitgevoerd.

1. Noteer de identiteit van het monster voor elk putje op het verstrekt notatieblad om te bepalen hoeveel strips er voor het uitvoeren van de assay nodig zijn. Voor controles en calibrator zullen drie putjes nodig zijn. Voor elk monster zal één putje nodig zijn.
2. Haal het microtiterplaatframe met de microtiterplaatstrips uit het foliezakje. Haal de microtiterplaatstrips die niet nodig zijn uit het frame en bewaar de niet gebruikte strips in het afgesloten foliezakje met droogmiddel. Het microtiterplaatframe moet aan het einde van de assay achterblijven zodat dit weer voor de resterende microtiterplaatstrips kan worden gebruikt.
3. Voeg 100 µl verdunde positieve controle toe aan een microputje, voeg 100 µl van de verdunde negatieve controle toe aan een ander microputje en voeg 100 µl verdunde calibrator toe aan een derde microputje.
4. Voeg 100 µl van elke verdund patiëntenmonster aan microputjes toe.
5. Incubeer gedurende 30 minuten.
6. Zuig de putjes af. Als er gebruik wordt gemaakt van een handmatig of semi-geautomatiseerd wasverdeelstuk, was dan drie maal als volgt. Pipetteer ongeveer 300 µl 1 x wasbuffer in elk putje, zuig vervolgens af. Vul de putjes opnieuw met ongeveer 300 µl 1 x wasbuffer en zuig een tweede keer af. Vul de putjes opnieuw met 300 µl 1 x wasbuffer en zuig een derde keer af. Zorg ervoor dat alle putjes na de derde (laatste) wasstap worden belucht. (wanneer een geautomatiseerde plaatwasser wordt gebruikt, was vier maal waarbij elke wassing bestaat uit 300-350 µl 1 x wasbuffer.) Sla de plaat bij zowel handmatig alsook geautomatiseerd wassen, na de laatste wassing, op absorberende doeken voor het verwijderen van alle resterende vloeistof.
7. Pipetteer in elk putje 100 µl conjugaat.
8. Incubeer gedurende 20 minuten.
9. Zuig de putjes af. Was de putjes met 1 x wasbuffer zoals in stap 6 hierboven.
10. Sla na de laatste wassing de plaat op absorberende doeken voor het verwijderen van alle resterende vloeistof.
11. Pipetteer in elk putje 100 µl substraat.
12. Incubeer gedurende 4 minuten. Let alstublieft op: Optimale werking van de assay vereist precieze timing van de substraatincubatiestap; de tijd moet vanaf de toevoeging aan het eerste putje worden gemeten.
13. Pipetteer in elk putje 100 µl stopoplossing in dezelfde volgorde als in de voorgaande stap het substraat werd verdeeld. Klop de plaat voorzichtig voor het mengen van de inhoud van de putjes. Lees de absorptiewaarden binnen 5 minuten.
14. Lees met behulp van een ELISA-plaatlezer de absorptie bij 450 nm met een referentiefilter van 650 nm. Indien de lezer niet met een 650 nm filter is uitgerust, gebruik dan een subsidiair filter tussen 590 – 650 nm, dit zal gelijkwaardige resultaten opleveren.

KWALITEITSCONTROLE:

1. De controlewaarden moeten binnen de volgende bereiken liggen teneinde de assay als geldig te kunnen beschouwen:
2. Negatieve controle $A_{450-650nm}$ moet $<0,18$ zijn.
3. Calibrator $A_{450-650nm}$ moet $<0,18$ zijn.
4. Positieve controle $A_{450-650nm}$ moet $>1,2$ zijn.

5. Indien een van de controle $A_{450-650nm}$ waardes niet in de hierboven weergegeven bereiken ligt, moet de assay worden herhaald.

BEREKENINGEN:

1. Bereken de uitsluitingswaarde van de assay door 0,3 aan de absorptiewaarde van de calibrator toe te voegen.
2. Bereken voor elk patiëntenmonster de Lyme Index (LI) waarde door de $A_{450-650nm}$ van het monster door de uitsluitingswaarde te delen.

INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN:

Lyme Index

Interpretatie

$\leq 0,90$

Negatief resultaat. In de onderhavige assay is geen antilichaam tegen C6-peptide gedetecteerd. Dit resultaat sluit de mogelijkheid van *B. burgdorferi s.l.* infectie niet uit, en waar een verdenking is van vroege ziekte van Lyme, moet 2 – 4 weken later een tweede monster worden afgenomen en opnieuw worden getest.

0,91-1,09

Twijfelachtig resultaat. De onnauwkeurigheid die inherent is aan elke werkwijze impliceert een lagere mate van betrouwbaarheid bij de interpretatie van monsters met $A_{450-650nm}$ waarden die erg dicht tegen de berekende uitsluitingswaarde liggen. Om deze reden is er een categorie met twijfelachtige resultaten aangewezen. Monsters die twijfelachtige resultaten geven moeten opnieuw worden getest. Als het opnieuw testen een twijfelachtig resultaat geeft, moet een nieuw serummonster worden verkregen en getest.

$\geq 1,10$

Positief resultaat. In de onderhavige assay is antilichaam tegen C6-peptide gedetecteerd.

Voor elk gebruik van de assay wordt een uitsluitingswaarde bepaald door aan de Calibrator absorptiewaarde 0,3 toe te voegen. Op deze wijze is de uitsluitingswaarde bedoeld om voor variaties tussen verschillende gebruiken van assays te compenseren, welke anders de gevoeligheid en specificiteit zouden kunnen beïnvloeden. De calibrator is ontworpen om een absorptiewaarde te geven die de achtergrondreactiviteit van normaal sera reflecteert.

BEPERKINGEN:

1. Een negatief resultaat sluit niet de mogelijkheid van infectie met *B. burgdorferi s.l.* uit. Het is mogelijk dat patiënten in vroege stadia van de ziekte van Lyme en diegenen die met antibiotica zijn behandeld, geen detecteerbare antilichaamtiter vertonen. Patiënten met klinische geschiedenis, tekenen of symptomen die duiden op de ziekte van Lyme moeten wanneer het initiële testresultaat negatief is binnen 2-4 weken opnieuw worden getest.
2. Een positief resultaat is geen definitief bewijs van infectie met *B. burgdorferi s.l.* Het is mogelijk dat een reactiviteit in de assay een artefact is en het gevolg is van een andere ziekte.
3. Deze assay moet niet worden gebruikt voor het screenen van de algemene populatie. De voorspellende waarde van de assay is een functie van de waarschijnlijkheid van de ziekte van Lyme in de geteste populatie vóór de test. Daarom moeten alleen patiënten met klinische symptomen van de ziekte van Lyme of met verdenking van blootstelling aan *B. burgdorferi s.l.* worden getest.
4. Gehemolyseerde, lipemische, bilirubinemische of troebele monsters kunnen resultaten produceren die een artefact zijn. Voor het her testen moet een vers monster worden verzameld.
5. Hoewel speciale opleiding is niet nodig, optimale prestatie vereist strikte opvolging van de assayprocedure die in de bijsluiting wordt beschreven. Afwijkingen van de procedure kunnen leiden tot afwijkende resultaten.
6. Vals-positieve resultaten kunnen worden verkregen met sera van patiënten met ziekten anders dan de ziekte van Lyme waaronder syfilis, parodontologische ziekte, reumatoïde artritis, systemische lupus erythematosus, en andere auto-immuun- of infectieziekten.

PRESTATIEKENMERKEN:

De prestatie van de C6 Lyme ELISA™ Kit werd met betrekking tot specificiteit en gevoeligheid van detectie vergeleken met die van het tweelaags-protocol aanbevolen door de CDC¹² (monsters die met ELISA positief of twijfelachtig werden bevonden werden opnieuw getest door IgG en IgM Western Blot teneinde het eindresultaat te bepalen).

SPECIFICITEIT:

Van 1 842 normale bloeddonoren waren serummonsters verkregen, omvattende 1 329 sera van personen die wonen in gebieden die endemisch zijn voor de ziekte van Lyme (het noordoosten van de V.S.) en 513 sera van personen die wonen in gebieden die worden beschouwd als niet-endemisch voor de ziekte van Lyme (het zuidwesten van de V.S.). Sera werden met de C6 Lyme ELISA™ Kit en met het tweelaags-protocol getest waarbij gebruik werd gemaakt van een ELISA waarbij in de eerste stap hele cellen worden gesoniceerd (tabel 1). De specificiteit van de C6 Lyme ELISA™ Kit was statistisch gelijkwaardig aan die van het tweelaags-protocol voor gezonde bloeddonoren uit zowel endemische alsook niet-endemische gebieden ($p > 0,05$).

Zie Bijlage: Tabel 1. Reactiviteit in bloeddonoren uit endemische en niet-endemische gebieden

GEVOELIGHEID:

Er was een totaal van 517 goed gekarakteriseerde serummonsters verkregen van Noord-Amerikaanse patiënten die op basis van ofwel (1) gedocumenteerde erythema migrans; (2) kweek- of PCR-positief voor *B. burgdorferi*; of (3) Lyme artritis of andere symptomen van gevorderde ziekte van Lyme, met de ziekte van Lyme waren gediagnosticeerd. Positieve serologie was geen criterium voor insluiting in deze groep.

Met de groep Lyme-patiënten werd de C6 Lyme ELISA™ Kit in vergelijking met het tweelaags-protocol geëvalueerd. In het algemeen detecteerde de C6 Lyme ELISA™ 74,9% van de Lyme-patiënten, vergeleken met de 55,3% die door het tweelaags-protocol positief werden bevonden (tabellen 2 en 3). De gevoeligheid van de C6 Lyme ELISA™ vs. tweelaags-protocol voor het detecteren van Lyme-patiënten met positieve kweek wordt weergegeven in tabel 3.

Zie Bijlage: Tabel 2. C6 Lyme ELISA™ vs. Tweelaags-protocol

Zie Bijlage: Tabel 3. Gevoeligheid naar definitie criteria van het monster

De gevoeligheid van de C6 Lyme ELISA™ Kit voor het detecteren van antilichamen tegen *B. burgdorferi* in sera van Lyme-patiënten werd eveneens met betrekking tot symptoomcategorie geëvalueerd. Een vergelijking van de gevoeligheid van C6 Lyme ELISA™ en het tweelaags-protocol wordt weergegeven in tabel 4.

Zie Bijlage: Tabel 4. Gevoeligheid naar symptoomcategorie

Monsters van Lyme-patiënten ingedeeld naar de tijdsduur na aanvang van de ziekte werden getest met de C6 Lyme ELISA™ Kit vs. het tweelaags-protocol zoals weergegeven in tabel 5.

Zie Bijlage: Tabel 5. Gevoeligheid naar tijdsduur na aanvang

Een analyse van de reactiviteit in de subset van Lyme-patiënten die met IgG en IgM Western Blot positief waren, toonde aan dat 100% van de patiënten die positief waren met IgG Western Blot (n=157) en 95,8% van de patiënten die positief waren met IgM Western Blot (n=192) eveneens positief waren bevonden door C6 Lyme ELISA™ (tabel 6). Daarentegen was 47,5% van de patiënten die positief waren met C6 Lyme ELISA™ (n=387) positief met IgM Western Blot, en 40,7% (n=386) waren positief met IgG Western Blot.

Zie Bijlage: Tabel 6. C6 Lyme ELISA™ vs. Western Blot resultaten

PROSPECTIEVE ONDERZOEKSRESULTATEN:

Een prospectief onderzoek werd uitgevoerd op 1 276 serummonsters die serieel waren ontvangen bij twee referentielaboratoria voor Lyme-screeningstesten. Sera werden getest met C6 Lyme ELISA™ en met het tweelaags-protocol (tabel 7). In 98,5% van de geteste monsters werden overeenstemmende resultaten gevonden.

Zie Bijlage: Tabel 7. Prospectieve monsters: C6 Lyme ELISA™ vs. Tweelaags resultaten

KRUISREACTIEVE OMSTANDIGHEDEN:

Sera van 366 personen met ziektes anders dan de ziekte van Lyme werden met de C6 Lyme ELISA™ op kruisreactiviteit getest. De resultaten voor zeventien aandoeningen worden gegeven in tabel 8. Twee sera werden positief bevonden door zowel de C6 ELISA alsook door het tweelaags-protocol, terwijl een additioneel serum positief was met het tweelaags-protocol alleen (tabel 9). De C6 Lyme ELISA™ demonstreerde in alle categorieën een algehele specificiteit van 99,5%.

Zie Bijlage: Tabel 8. Kruisreactieve omstandigheden: C6 Lyme ELISA™ resultaten

Zie Bijlage: Tabel 9. Aandoeningen van kruisreactiviteit C6 Lyme ELISA™ vs. Tweelaags-protocol

REPRODUCEERBAARHEID

De reproduceerbaarheid werd getest met een panel van 8 monsters, waaronder de positieve en negatieve controles uit de kit en 6 monsters die 2 negatieve, 2 zwak reactieve en 2 positieve sera vertegenwoordigen. Reproduceerbaarheid werd vastgesteld in vier analyses: Intra-assay, inter-assay, inter-partij, en inter-locatie. Resultaten van elk van deze analyses zijn in de volgende tabel samengevat.

Zie Bijlage: Tabel 10. Reproduceerbaarheid: C6 Lyme ELISA™ resultaten

IMMUNETICS, INC. CONTACTINFORMATIE:

Immunitics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 VS
Tel.: 800-227-4765 of +1 617-896-9100
Fax: +1 617-896-9110
Email: info@immunitics.com

EUROPESE GEMACHTIGDE VERTEGENWOORDIGER:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussels, BELGIË
Tel: (32) 2.732.59.54
Fax: (32) 2.732.60.03
Email: mail@obelis.net



Immunitics® C6 Lyme ELISA™-sett
Kat.nr.: DK-E601-096
96 tester
For *In Vitro*-diagnostisk bruk

OPPSUMMERING:

Lyme-sykdom er en sykdom på flere systemer forårsaket av en infeksjon med en hvilken som helst av de tre genospeciesene til spiroket *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2}, inkludert *B. burgdorferi*, *B. garinii* og *B. afzelii*. Overføring av sykdommen forekommer gjennom bittet av flere arter av *Ixodes*-flått som finnes i USA³⁻⁵, Europa⁶, Russland og andre land i Asia.

Ettersom den går gjennom forskjellige trinn, produserer Lyme-sykdom en rekke kliniske symptomer^{2,7}. Det første tegnet på infeksjon (primærfase) er utviklingen av et sirkelformet hudutslett kalt "erythema migrans" (EM) ved bittet. Dette forekommer hos 60–80 % av pasienter innen noen få dager eller uker etter den innledende infeksjonen; noen pasienter utvikler det ikke eller legger kanskje ikke merke til det. Generelle influensalignende symptomer (hodepine, magesmerter og slapphet) følger ofte med eller kommer etter dette utslettet. Uker til måneder etter utvikler sykdommen seg til sin sekundære fase. Denne fasen karakteriseres ofte av smerter i muskler og skjelett eller artritt, nevrologiske avvik og/eller hjertekomplikasjoner. Korte artrittfall som påvirker store lett blir mer vedholdende med tiden og kan føre til en kronisk tilstand i send infeksjon (tertiær fase). Andre manifestasjoner av infeksjon i senfasen omfatter Acrodermatitis Chronicum Atrophicans, en hudlesjon, og forskjellige nevrologiske sykdommer forbundet med nevroboreliose.

Serologisk testing har vist seg å være nyttig i påvisning av antistoffresponsen til *B. burgdorferi* som er et supplement til diagnose. I de fleste Lyme-pasienter er antistoffresponsen til spiroketantigener påvises i løpet av uker etter infeksjon. Sensitiviteten og spesifisiteten til responsen samt tidsløpet og antistoffklassen varierer avhengig av antigenet.

Antigenet som brukes i Immunitics® C6 Lyme ELISA™-settet, er et syntetisk peptid (C6 peptid*) utvunnet av VlsE-proteinet som har vist seg å være både spesifikt og svært immunogenisk¹³⁻²⁰. Peptidsekvensen konserveres og er like antigenisk i mennesker infisert med *Borrelia burgdorferi sensu stricto* eller med europeiske genospecies inkludert *Borrelia afzelii* og *Borrelia garinii*¹⁶. Ettersom antigenet representerer en definert sekvens inni proteinet, er potensiell kryssreaktivitet med urelaterte og delvis relaterte antigener som finnes i andre organismer, svært redusert.

*Amerikanske patenter 6,475,492, 6,719,983 og 6,740,744 og internasjonale patenter.

PRINSIPP:

Immunitics® C6 Lyme ELISA™-settet er basert på et syntetisk peptidantigen (C6-peptid) i mikrobrønn med ELISA-format. I analyseprosedyren tilføres fortynnete serumprøver til og inkuberes i brønner med en antigenbelagt mikrobrønnplate. Antistoffer som er spesifikke for C6-peptidet i serumprøven, er bundet av det immobiliserte antigenet og ubundne antistoffer fjernes via vasketrinn. De bundne antistoffene registreres ved tilsetning av en pepperrotperoksidase-konjugert (HRP) geite-antihumant IgG/IgM-konjugat. Etter å ha fjernet overflødig konjugat via ytterligere vasketrinn, tilføres et kromogenisk peroksidasesubstrat som inneholder tetrametylbenzidin (TMB). Et blå/grønt produkt produseres i brønnene der antistoffene har vært bundet til antigenet. Fargeutviklingsreaksjonen undertrykkes ved å tilføre fortynnet svovelsyre som produserer en gul fargeendring. Etter dette måles optisk absorbans ved 450 nm, korrigert ved en bakgrunnssubstraksjon på 590–650 nm, i hver brønn ved bruk av en ELISA-mikroplateleser.

REAGENSER SOM FØLGER MED:

1. Mikrobrønnplate (Delenummer CB-P005-096). 96 brønner med tolv remser hver som inneholder 8 brønner og oppbevares i en foliepose som kan forsegles flere ganger, med tørkemiddel.
2. Positiv kontroll (0,300 ml) (Delenummer CB-L018-300). Humant kildemateriale tilsatt gentamicin og ProClin som konserveringsmidler.
3. Negativ kontroll (0,300 ml) (Delenummer CB-N023-300). Humant kildemateriale tilsatt gentamicin og ProClin som konserveringsmidler.
4. Cutoff-kalibrator (0,300 ml) (Delenummer CB-N030-300). Humant kildemateriale tilsatt gentamicin og ProClin som konserveringsmidler. Brukes til å kalibrere cutoff-verdien til analysen.
5. Konjugat (15 ml) (Delenummer CB-A028-015). Geite-antihumant IgG/IgM pepperrotperoksidatekonjugat, klar til bruk.
6. Prøvefortynner (30 ml) (Delenummer CC-S004-030). Fortynningsbuffer som inneholder gentamicin og ProClin som konserveringsmidler, klar til bruk.
7. TMB ELISA-substrat (15 ml) (Delenummer CC-S003-015). Løsning som inneholder hydrogenperoksid og TMB, klar til bruk.
8. 10X vaskebufferkonsentrat (60 ml) (Delenummer. CC-B001-060). Inneholder fosfatbufret saltvannsløsning og Tween-20-vaskemiddel med ProClin tilsatt som konserveringsmiddel, klar til bruk.
9. Stoppløsning (15 ml) (Delenummer CC-S005-015). Syreholdig løsning, klar til bruk.

FORHOLDSREGLER:

1. Det humane kildematerialet som blir brukt i dette settet, har testet negativt gjennom FDA-godkjente metoder for antistoffer for HIV-1 og HIV-2, hepatitt C- hepatitt-B-overflateantigen. Fordi ingen testmetode kan gi en fullstendig garanti om at de smittefarlige stoffene er fraværende, må imidlertid alle kontroller og testprøver behandles som om de er i stand til å overføre smittefarlige stoffer. De skal anses som potensielt smittefarlige og håndteres ved biosikkerhetsnivå 2 som anbefalt av håndboken "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition*", 1999 fra CDC/Nasjonale helseinstitusjoner).
2. Bruk egnet personlig verneutstyr mens du kjører analysen. Ikke la reagenser komme i kontakt med hud, øyne eller munn da det kan føre til irritasjon. Vask grundig med vann hvis noen form for kontakt skulle forekomme. Ikke munnpipetter reagensene.
3. Forsegl kontroller og kalibrator godt etter bruk for å redusere fordampning til et minimum.
4. Stoppløsningen inneholder svovelsyre. Avfall som inneholder stoppløsning må gjøres pH-nøytral før kassering. Forsiktig: Tilsetning av natriumhypokloritt (blekemiddel) til løsninger som inneholder svovelsyre, vil produsere giftig klorgass.
5. Bruk ubrukte pipettespisser for pipettering av hver prøve og reagens. Hvis du gjenbraker pipettespisser, kan du introdusere kontaminering.
6. Kasser brukte analysereagenser og prøver i henhold til relevante biofareprosedyrer.
7. Ikke bland reagenser fra sett med forskjellige lotnumre. Ikke bruk settkomponenter utover holdbarhetsdatoen på etiketten.
8. Alle settkomponenter må ha romtemperatur (19–26 °C) før analysen starter.
9. TMB ELISA-substrat er følsomt overfor lys og metallioner. Unngå eksponering mot lys og metallioner.
10. Bruk bare destillert eller deionisert vann for klargjøring av buffere i analysen.
11. Bruk hansker når du håndterer mikrobrønnplateremsene.
12. Følg instruksjonene i pakningsvedlegget for å få optimal, reproducerbar og nøyaktig ytelse fra testen. Avvik fra instruksjonene i dette vedlegget kan føre til falske resultater.
13. Ikke forhåndsvask brønner med vaskebuffer eller prøvefortynner.
14. Ikke bland flaskekorkene til TMB ELISA-substrat og -konjugat.

NØDVENDIGE MATERIALER SOM IKKE FØLGER MED:

1. Graderte sylindre for å måle væske
2. Flaske med vaskebuffer på 1 liter
3. Dråpetellere til å dispensere 10 µl til 200 µl (dråpetellere med flere kanaler eller 10 µl, 100 µl og 200 µl anbefales)
4. Mikrobrønnplate eller prøverør uten belegg for prøvefortynning
5. Destillert eller deionisert vann
6. Tidtaker (0–60 minutter)
7. ELISA-leser med filter på 450 nm og et referansefilter på 590–650 nm
8. Vakuumaspirator eller -kassering betyr for analyseløsninger (aspirator med flere kanaler er anbefalt)
9. Absorberende papir
10. Sentrifuge med en kapasitet på 10 000 o/min

VALGFRITT UTSTYR:

1. Automatisk platevasker

OPPBEVARING OG HOLDBARHETS DATO FOR REAGENSER:

1. Oppbevar uåpnede sett 2–8 °C. Holdbarhetsdatoen står på settetiketten.
2. Ubrukte mikroplateremser skal oppbevares 2–8 °C forseglet i den originale folieposen med tørkemiddel.
3. Settkomponenter omfatter kontroller, kalibrator, HRP-konjugat, substrat, stoppløsning, prøvefortynner og 10X-vaskebufferkonsentrat skal oppbevares mellom 2–8 °C.
4. 1X (fungerende) vaskebufferløsning kan oppbevares ved romtemperatur (19–26 °C) i opptil 30 dager.
5. TMB ELISA-substrat skal oppbevares i lysbeskyttende flasker som ikke inneholder metallioner. Holdbarheten til substrat er basert på oppbevaring i ravfargede plastflasker som følger med settet.
6. Ikke bruk settkomponenter utover holdbarhetsdatoen.

PRØVETAKING:

1. Ferske humane serumprøver skal innhentes og enten oppbevares ved 2–8 °C hvis testingen finner sted innen 10 dager, eller frosne.
2. Hemolyserte eller lipemiske sera og sera som utsettes for flere sykluser med frysing og tining, kan gi uregelmessige resultater.
3. Sentrifuger sera i 1 minutt ved 10 000 o/min i en mikrosentrifuge for å fjerne eventuell synlig fellingsreaksjon.
4. Ikke test prøver som viser tegn på mikrobiell kontaminasjon.
5. Analysen er tiltenkt for bruk med humant serum. Bruken av plasma med denne analysen har ikke blitt etablert.

KLARGJØRING AV REAGENS, KONTROLL, KALIBRATOR OG PRØVE:

1. 1X-vaskebuffer: For klargjøring én gang tilsetter du 60 ml med 10X-vaskebufferkonsentrat til 540 ml deionisert/destillert vann i en 1 litersflaske, og rør godt. **Merk:** Når 10X-vaskebufferkonsentrat tas ut av kjøleskapet, kan uoppløste salter være

- tilstede. La reagensen nå romtemperatur, og rist flasken for å løse opp saltene.
2. Kontroller og kalibrator: Sentrifuger kontroller og kalibrator ved $10\,000 \times g$ i 10 sekunder før bruk for å legge igjen all væsken i bunnen av røret. (Forut for dispensering, hvis kontroller er lagt merke til for å være overdrevent regn, har bevis for koagulering eller er vanskelige å pipette, sentrifuger en gang i 1 minutt ved $10\,000$ opm.) Dispenser $200\ \mu\text{l}$ prøvefortynning i tre rene prøverør eller mikroplatebrønner uten belegg. Tilsett $10\ \mu\text{l}$ negativ kontroll til ett rør eller én brønn; tilsett $10\ \mu\text{l}$ positiv kontroll i et annet rør eller en annen brønn; tilsett $10\ \mu\text{l}$ med kalibrator til et tredje rør eller brønn og bland godt.
 3. Pasientprøver: Dispenser $200\ \mu\text{l}$ prøvefortynning i hver av en serie med rør eller mikroplatebrønner uten belegg, nok til antallet prøver som skal testes. Tilsett $10\ \mu\text{l}$ av hver prøve til det korresponderende røret eller brønnen, og bland godt.

ANALYSEPROSEDYRE:

La alle analysereagenser få (19–26 °C) før analysen startes. Alle trinn utføres i romtemperatur (19–26 °C).

1. Registrer prøveidentiteten for hver brønn i det medfølgende registreringskjemaet for å fastslå antall remser som er nødvendig for å utføre analysen. Det trengs tre brønner for kontroller og kalibrator. Én brønn er nødvendig for hver prøve.
2. Fjern mikroplaterammen som inneholder mikroplateremsene, fra folieposen. Fjern uønskede mikroplateremser fra rammen, og forsegl ubrukte remser i folieposen med tørkemiddel. Mikroplaterammen skal beholdes når analysen er over for å brukes med de gjenværende mikroplateremsene.
3. Tilsett $100\ \mu\text{l}$ fortynnet positiv kontroll til én mikrobrønn, $100\ \mu\text{l}$ fortynnet negativ kontroll til en annen mikrobrønn og $100\ \mu\text{l}$ fortynnet kalibrator i en tredje mikrobrønn.
4. Tilsett $100\ \mu\text{l}$ av hver av de fortyndede pasientprøvene i mikrobrønner.
5. Inkuber i 30 minutter.
6. Aspirer brønner. Hvis du bruker manuell eller halvautomatisk vaskemanifold, må du vaske tre ganger på følgende måte. Dispenser omkring $300\ \mu\text{l}$ med 1X-vaskebuffer i hver brønn og aspirer. Fyll brønnene på nytt med omkring $300\ \mu\text{l}$ med 1X-vaskebuffer, og aspirer for andre gang. Fyll brønnene med $300\ \mu\text{l}$ med 1X-vaskebuffer, og aspirer en tredje gang. Sørg for at alle brønnene har blitt aspirert etter det tredje (siste) vasketrinne. (Hvis det brukes en automatisk platevasker, skal du vaske fire ganger med hver vask bestående av $300\text{--}350\ \mu\text{l}$ 1X-vaskebuffer.) For både manuell og automatisk vasking, etter den siste vasken, klapper du lett på platen med absorberende papir for å fjerne all væske som er igjen.
7. Dispenser $100\ \mu\text{l}$ konjugat i hver brønn.
8. Inkuber i 20 minutter.
9. Aspirer brønner. Vask brønnene med 1X-vaskebuffer som i trinn 6 over.
10. Etter siste vask, klapper du lett på platen med absorberende papir for å fjerne all gjenværende væske.
11. Dispenser $100\ \mu\text{l}$ substrat i hver brønn.
12. Inkuber i 4 minutter. Merk: Optimal analyseytelse krever nøyaktig timing i substratinkubasjonstrinnet; timing skal måles fra tilsetningen i første brønn.
13. Dispenser $100\ \mu\text{l}$ stoppløsning i hver brønn i samme rekkefølge som substratet ble dispensert i forrige trinn. Dunk lett på platen for å blande innholdet i brønnene. Les absorbansverdiene innen 5 minutter.
14. Les absorbans ved $450\ \text{nm}$ med et referansefilter på $650\ \text{nm}$ ved bruk av en ELISA-plateleser. Hvis leseren ikke er utstyrt med et filter på $650\ \text{nm}$, kan bruk av et alternativt filter på mellom $590\text{--}650\ \text{nm}$ gi tilsvarende resultater.

KVALITETSKONTROLL:

1. Kontrollverdier må være innenfor følgende områder for at analysen kan anses som gyldig:
2. Negativ kontroll $A_{450-650\ \text{nm}}$ må være $< 0,18$.
3. Kalibrator $A_{450-650\ \text{nm}}$ må være $< 0,18$.
4. Positiv kontroll $A_{450-650\ \text{nm}}$ må være $> 1,2$.
5. Hvis noen kontroll $A_{450-650\ \text{nm}}$ -Verdi ikke er innenfor områdene ovenfor, må analysen gjentas.

BEREGNINGER:

1. Beregn cutoff-verdien ved å legge til 0,3 til kalibratorabsorbansverdien.
2. Beregn Lyme-indeksverdien (LI) for hver pasientprøve ved å dele $A_{450-650\ \text{nm}}$ til prøven med cutoff-verdien.

TOLKNING AV RESULTATER:

| <u>Lyme-indeks</u> | <u>Tolkning</u> |
|---------------------|---|
| $\leq 0,90$ | Negativt resultat. Ingen antistoffer for C6-peptidet påvist i den gjeldende analysen. Dette resultatet utelukker ikke muligheten for infeksjon av <i>B. burgdorferi</i> s.l., og der tidlig Lyme-sykdom mistenkes, må en ny prøve tas 2–4 uker senere og testes på nytt. |
| $0,91\text{--}1,09$ | Tvetydig resultat. Den naturlige unøyaktigheten til enhver metode antyder en lavere grad av sikkerhet i tolkningen av prøver med $A_{450-650\ \text{nm}}$ -verdier svært nær den beregnede cutoff-verdien. Av den grunn har det blitt opprettet en tvetydig kategori. Prøver som gir tvetydige resultater skal testes på nytt. Hvis den nye testen gir et tvetydig resultat, må en ny serumprøve innhentes og testes. |
| $\geq 1,10$ | Positivt resultat. Antistoffer for C6-peptid påvist i den gjeldende analysen. |

Cutoff-verdien avgjøres for hver analyse ved å legge til 0,3 til kalibratorabsorbansverdien. På denne måten er cutoff-verdien tiltenkt å kompensere for analyse-til-analysevariasjonene som ellers kan påvirke sensitivitet og spesifisitet. Kalibratoren har blitt utformet for å gi en absorbansverdi som reflekterer bakgrunnsreaktiviteten til normalt sera.

BEGRENSNINGER:

1. Et negativt resultat utelukker ikke muligheten for infeksjon av *B. burgdorferi* s.l. Pasienter i tidlige stadier av Lyme-sykdom og de som har blitt behandlet med antibiotika, viser ikke nødvendigvis påviselige antistofftitere. Pasienter med klinisk historikk, tegn eller symptomer som vitner om Lyme-sykdom skal testes på nytt om 2–4 uker hvis det første testresultatet er negativt.
2. Et positivt resultat er ikke endelig bevis på infeksjon av *B. burgdorferi* s.l. Det er mulig at andre sykdomstilstander kan forårsake kunstig reaktivitet i analysen.
3. Denne analysen skal ikke brukes for å screene allmenheten. Prediksjonsverdien av analysen er en funksjon for forhåndstestsannsynligheten for Lyme-sykdom hos befolkningen som blir testet. Derfor skal kun pasienter med kliniske symptomer på Lyme-sykdom eller med mistenkt eksponering for *B. burgdorferi* s.l. bli testet.
4. Hemolyserte, lipemiske, bilirubin- eller turbidprøver kan gi kunstige analyseresultater. Det må innhentes en fersk prøve for ny testing.
5. Selv om spesialopplæring ikke er nødvendig, optimal ytelse krever at analyseprosedyren som beskrives i vedlegget følges nøye. Avvik fra prosedyren kan føre til avvikende resultater.
6. Sera fra pasienter med andre sykdommer enn Lyme-sykdom, blant annet syfilis, tannsykdom, leddgikt, systemisk lupus erythematosus og andre autoimmune eller smittsomme sykdommer, kan gi falske positive resultater.

YTELSESEGENSKAPER:

Ytelsen til C6 Lyme ELISA™-settet ble sammenlignet med tofaseprotokollen anbefalt av CDC¹² (prøver som viser seg å være positive eller tvetydige med ELISA, testes på nytt med IgG og IgM Western Blot for å bestemme det endelige resultatet) i forbindelse med registreringsspesifisitet og -sensitivitet.

SPESIFISITET:

Serumprøver ble innhentet fra 1 842 normale blodgiver som omfattet 1 329 sera fra personer som bor i områder endemiske for Lyme-sykdom (nordøstlige USA) og 513 sera fra personer som bor i områder som anses som ikke-endemiske for Lyme-sykdom (sørvestlige USA). Sera ble testet med C6 Lyme ELISA™-settet og med tofaseprotokoll ved å bruke helcellesonikat-ELISA i første fase (tabell 1). Spesifisiteten til C6 Lyme ELISA™-settet var statistisk tilsvarende tofaseprotokollen for både endemiske og ikke-endemiske, friske blodgivere ($p > 0,05$).

Se Vedlegg: Tabell 1. Reaktivitet i endemiske og ikke-endemiske blodgivere

SENSITIVITET:

Totalt 517 velkarakteriserte serumprøver ble hentet fra nordamerikanske pasienter som ble diagnostisert med Lyme-sykdom basert på enten (1) dokumenterte erythema migrans, (2) kultur eller PCR som var positive for *B. burgdorferi* eller (3) Lyme-artritt eller andre symptomer på disseminert Lyme-sykdom. Positiv serologi var ikke et kriterium for inkludering i gruppen.

C6 Lyme ELISA™-settet ble vurdert i sammenligning med tofaseprotokollen på Lyme-pasientgruppen. Totalt sett registrerte C6 Lyme ELISA™ 74,9 % av Lyme-pasientene sammenlignet med 55,3 % som ble funnet positive av tofaseprotokollen (tabell 2 og 3). Sensitiviteten til C6 Lyme ELISA™ kontra tofaseprotokollen for påvisning av Lyme-pasienter med positiv kultur, vises i tabell 3.

Se Vedlegg: Tabell 2. C6 Lyme ELISA™ kontra tofaseprotokoll

Se Vedlegg: Tabell 3. Sensitivitet ved prøvedefinisjonskriterium

Sensitiviteten til C6 Lyme ELISA™-sett for påvisning av antistoffer mot *B. burgdorferi* hos Lyme-pasientsera ble også vurdert med tanke på symptomkategori. En sensitivitetssammenligning for C6 Lyme ELISA™ og tofaseprotokollen vises i tabell 4.

Se Vedlegg: Tabell 4. Sensitivitet ved symptomkategori

Lyme-pasientprøver stratifisert av tid etter sykdommens debut, ble testet med C6 Lyme ELISA™-settet kontra tofaseprotokollen som vist i tabell 5.

Se Vedlegg: Tabell 5. Sensitivitet ved tid etter debut

En reaktivitetsanalyse i subsettet IgG og IgM Western Blot-positive Lyme-pasienter viste at 100 % av pasientene med positive IgG Western Blot (n=157) og 95,8 % av pasienter med positive IgM Western Blot (n=192) også var positive med C6 Lyme ELISA™ (tabell 6). Motsatt var 47,5 % av pasienter som var positive med C6 Lyme ELISA™ (n=387), positive med IgM Western Blot, og 40,7 % (n=386) var positive med IgG Western Blot.

Se Vedlegg: Tabell 6. C6 Lyme ELISA™ vs. Western Blot resultater

PROSPEKTIVE STUDIERESULTATER:

En prospektiv studie ble utført på 1 276 serumprøver som serielt ble mottatt ved to referanselaboratorier for Lyme-screeningtester. Sera ble testet med C6 Lyme ELISA™ og med tofaseprotokollen (tabell 7). Det ble funnet overensstemmende resultater i 98,5 % av prøvene som ble testet.

Se Vedlegg: Tabell 7. Prospektive prøver: Resultater av C6 Lyme ELISA™ kontra tofase

KRYSSREAKTIVE TILSTANDER:

Sera fra 366 personer med andre sykdomstilstander enn Lyme-sykdom ble testet for kryssreaktivitet med C6 Lyme ELISA™. Resultater for sytten tilstander vises i tabell 8. To sera ble påvist å være positive av både C6 ELISA og tofaseprotokoll mens ett serum til var positiv kun med tofaseprotokoll (tabell 9). C6 Lyme ELISA™ demonstrerte en generell spesifisitet på 99,5 % i alle kategorier.

Se Vedlegg: Tabell 8. Kryssreaktive tilstander: Resultater fra C6 Lyme ELISA™

Se Vedlegg: Tabell 9. Kryssreaktive tilstander: C6 Lyme ELISA™ kontra tofaseprotokoll

REPRODUSERBARHET:

Reproduserbarhet ble testet på et panel med 8 prøver, inkludert settet for positive og negative kontroller og 6 prøver representerte 2 negative, 2 svakt reaktive og 2 positive sera. Reproduserbarheten ble vurdert i fire analyser: intraanalyse, interanalyse, interlot og intersted. Resultater fra hver av disse analysene er oppsummert i følgende tabell.

Se Vedlegg: Tabell 10. Reproduserbarhet: Resultater fra C6 Lyme ELISA™

KONTAKTINFORMASJON FOR IMMUNETICS, INC.:

Immunetics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tlf.: 800-227-4765 eller +1 617-896-9100
Faks: +1 617-896-9110
E-post: info@immunetics.com

AUTORISERT EUROPEISK REPRESENTANT:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussel, BELGIA
Tlf.: (32) 2.732.59.54
Faks: (32) 2.732.60.03
E-post: mail@obelis.net



Kit med Immunitics® C6 Lyme ELISA™
Katalognummer: DK-E601-096
96 undersökningar
För användning vid *in vitro*-diagnostik

SAMMANFATTNING:

Lyme borrelios är en multisystemsjukdom som orsakas av tre genospecies av *B. burgdorferi sensu stricto*^{1,2}, inklusive *B. garinii* och *B. afzelii*. Sjukdomen överförs genom bitt av fästingar av arten *Ixodes*, som finns i USA³⁻⁵, Europa⁶, Ryssland och andra länder i Asien.

Allteftersom Lyme borrelios utvecklas genom olika stadier orsakar den en mängd kliniska symtom^{2,7}. Det första tecknet på infektion (primärstadium) är utvecklingen av ett runt hudutslag, kallat erythema migrans (EM), på platsen för bittet. För 60-80 % av patienterna brukar detta ske inom några dagar eller veckor efter det inledande infektionstillfället. Hos en del patienter sker detta inte eller så förbises det. Allmänna influensasymtom (huvudvärk, magont och trötthet) yttrar sig ofta samtidigt som eller efter utslaget. Efter veckor eller månader utvecklas sjukdomen och går in i sekundärstadiet. Kännetecknande för detta stadium är värk eller artrit i muskler och ben, neurologiska avvikelser och/eller hjärtkomplikationer. Korta anfall av artrit, som påverkar lederna, blir med tiden mer ihållande och kan utvecklas till ett kroniskt tillstånd i långt gången infektion (tertiärstadium). Andra manifestationer av långt gången infektion inkluderar Acrodermatitis chronica atrophicans, en hudlesion, och olika neurologiska störningar relaterade till neuroborrelios.

Som komplement till diagnoser har serologisk undersökning visat sig vara användbar i detektionen av ett antikroppssvar på *B. burgdorferi*. Hos flertalet patienter kan ett antikroppssvar på spiroketantigener ses några veckor efter infektionstillfället. Svarets känslighet och specificitet liksom tidsförlopp och antikroppsklass varierar beroende på antigenen.

Den antigen som används i kitet Immunitics® C6 Lyme ELISA™ är en syntetisk peptid (C6-peptid*) från VlsE-protein, som visat sig vara både specifikt och starkt antigeniskt¹³⁻²⁰. Peptidsekvensen bevaras och är lika antigenisk hos människor som infekterats med *Borrelia burgdorferi sensu stricto* eller med europeiska genospecies inklusive *Borrelia afzelii* och *Borrelia garinii*⁶. Eftersom antigenen motsvarar en avgränsad sekvens inom proteinet, reduceras i hög grad potentiell korsreaktivitet med obesläktade och delvis besläktade antigener som förekommer i andra organismer.

*Amerikanska patent 6,475,492, 6,719,983, och 6,740,744 och internationella patent.

PRINCIP:

Kitet Immunitics® C6 Lyme ELISA™ baseras på en syntetisk peptidantigen (C6-peptid) i mikrotiterplattformatet ELISA. I undersökningsförfarandet tillsätts serumprover till brunnar i en antigenbelagd mikrotiterplatta och odlas däri. Antikroppar som är specifika för C6-peptiden i serumprovet binds av den fixerade antigenen och obundna antigener avlägsnas genom tvättsteg. De bundna antikropparna upptäcks via tillsats av pepparrotsperoxidaskonjugerat (HRP) get-antihuman IgG/IgM-konjugat. Efter att överskott av konjugatet avlägsnats i ytterligare tvättsteg tillsätts ett kromogent peroxidassubstrat innehållande tetrametylbenzidin (TMB). Ett blågrönt resultat ges i brunnar där antikroppar bundits till antigenen. Den färgskapande reaktionen dämpas genom en tillsats av utspädd svavelsyra, som ger en gul färgförändring. Därefter kan en optisk absorption på 450 nm, korrigerad av en bakgrundssubtraktion på 590 - 650 nm, uppmätas i varje brunn med en ELISA-mikrotiterplattläsare.

MEDFÖLJANDE REAGENSER:

1. Mikrotiterplatta (artikelnr. CB-P005-096). 96 brunnar på tolv lister med vardera 8 brunnar och förpackade i en återförslutningsbar foliepåse med torkmedel.
2. Positiv kontroll (0,300 ml) (artikelnr. CB-L018-300). Material av mänskligt ursprung med tillsatt gentamicin och ProClin som konserveringsmedel.
3. Negativ kontroll (0,300 ml) (artikelnr. CB-N023-300). Material av mänskligt ursprung med tillsatt gentamicin och ProClin som konserveringsmedel.
4. Brytpunktskalibrator (0,300 ml) (artikelnr. CB-N030-300). Material av mänskligt ursprung med tillsatt gentamicin och ProClin som konserveringsmedel. Används för att kalibrera undersökningens brytpunktsvärden.
5. Konjugat (15 ml) (artikelnr. CB-A028-015). Get-antihuman IgG/IgM-pepparrotsperoxidaskonjugat färdigt att använda.
6. Provutspädningsmedel (30 ml) (artikelnr. CC-S004-030). Buffertutspädningsmedel, innehållande gentamicin och ProClin som konserveringsmedel, färdig att använda.
7. TMB ELISA-substrat (15 ml) (artikelnr. CC-S003-015). Lösning innehållande väteperoxid och TMB, färdig att använda.
8. 10x tvättbuffertkoncentrat (60 ml) (artikelnr. CC-B001-060). Innehåller fosfatbuffrad saltlösning och Tween-20-rengöringsmedel med tillsatt ProClin som konserveringsmedel.
9. Stopplösning (15 ml) (artikelnr. CC-S005-015). Syralösning färdig att använda.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

1. Det material av mänskligt ursprung som används i detta kit har testats negativt via FDA-godkända metoder för antikroppar till hepatit HIV-1 och HIV-2, hepatit C och hepatit B:s ytantigen. Eftersom inga testmetoder kan ge full garanti för att dessa infektiösa agenter inte förekommer, ska alla kontroll- och undersökningspreparat därför hanteras som om de skulle kunna överföra infektiösa agenter. De ska betraktas som potentiellt infektiöst material och hanteras enligt biosäkerhetsnivå 2 enligt rekommendationer i CDC/National Institutes of Health:s handbok "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition", 1999.
2. Bär lämplig skyddsutrustning medan analysen körs. Låt inte reagenser komma i kontakt med hud, ögon eller mun då klåda kan uppstå. Tvätta noga med vatten om kontakt skulle ske. Munpipettera inte reagenser.
3. Förslut kontroller och kalibratorer ordentligt efter användning för att minimera avdunstning.
4. Stopplösningen innehåller svavelsyra. Avfall som innehåller svavelsyra ska göras pH-neutralt före kassering. Varning! Tillsats av natriumhypoklorit (blekningsmedel) till lösningar innehållande svavelsyra avger giftig klorgas.
5. Använd nya pipettoppar för varje prov och reagens. Att återanvända pipettoppar kan orsaka kontaminering.
6. Kassera använda analysreagenser och prover enligt korrekt förfarande för biologiskt riskavfall.
7. Blanda inte reagenser från kit med olika nummer. Använd inte kitkomponenter efter etikettens utgångsdatum.
8. Alla kitkomponenter ska hålla rumstemperatur (19 – 26 °C) innan analysen påbörjas.
9. TMB ELISA-substrat är känsligt för ljus och metalljoner. Undvik att utsätta det för ljus och metalljoner.
10. Använd endast destillerat eller avjoniserat vatten för beredning av buffertar i analysen.
11. Använd handskar vid hantering av mikrotiterplattlisterna.
12. För optimalt reproducerbart och exakt utförande av undersökningen ska bipacksedelns anvisningarna följas. Avvikelser från anvisningarna i bipacksedeln kan leda till falska resultat.
13. Förtvätta inte brunnar med tvättbuffert eller provutspädningslösning.
14. Blanda inte flaskkapsyler för TMB ELISA-substrat och konjugat.

NÖDVÄNDIGT MATERIAL SOM INTE MEDFÖLJER:

1. Graderade cylindrar för att mäta vätska
2. 1 enlitersflaska för tvättbuffert
3. Pipetter för att dispensera 10 µL till 200 µL (multikanalspipetter rekommenderas eller 10 µL, 100 µL och 200 µL pipetter)
4. Obelagd mikrotiterplatta eller provrör för provutspädningslösning.
5. Destillerat eller avjoniserat vatten
6. Tidtagare (0 - 60 minuter)
7. ELISA-läsare med ett filter på 450 nm och ett referensfilter på 590 - 650 nm
8. Vakuumsugare eller kasseringsmetoder för analyslösningar (multikanalsugare rekommenderas)
9. Absorberande handdukar
10. Centrifug som klarar 10 000 varv per minut

TILLVALSUTRUSTNING:

1. Automatisk plattdiskmaskin

FÖRVARING AV OCH HÅLLBARHETSTID FÖR REAGENSER:

1. Förvara öppnat kit mellan 2 - 8 °C. Utgångsdatum finns på kitetiketten.
2. Oanvända mikrotiterplattlistor ska förvaras mellan 2 - 8 °C och i försluten originalfoliepåse med torkmedel.
3. Kitkomponenterna, inklusive kontroller, kalibrator, HRP-konjugat, substrat, stopplösning, provutspädningslösning och 10 x tvättbuffertkoncentrat, ska förvaras mellan 2 - 8 °C.
4. 1 x (aktiv) tvättbuffertlösning kan förvaras i rumstemperatur (19 - 26 °C) i upp till 30 dagar.
5. TMB ELISA-substratet ska förvaras i ljusskyddande flaskor som inte innehåller metalljoner. Substratets hållbarhetstid grundas på att det förvaras i den bärnstensfärgade plastflaskan som medföljer kitet.
6. Kitkomponenter får ej användas efter etikettens utgångsdatum.

INSAMLING AV PREPARAT:

1. Färskt mänskligt serumpreparat ska insamlas och förvaras vid 2 - 8 °C om undersökningen ska göras inom 10 dagar, eller frysas.
2. Hemolyserade eller lipemiska sera, samt sera som undergått flera frysnings-upptiningscykler kan ge onormala resultat.
3. Centrifugera sera i 1 minut i en mikrocentrifug på 10 000 varv per minut för att avlägsna alla synliga utfällningar före undersökningen.
4. Undersök inte prover som visar sig vara mikrobiellt kontaminerade.
5. Undersökningen är avsedd att användas med mänskligt serum. Användning av plasma med denna analys har inte säkerställts.

REAGENS, KONTROLL, KALIBRATOR OCH PROVBEREDNING:

1. 1 x tvättbuffert: För direkt beredning tillsätts 60 ml av 10 x tvättbuffertkoncentrat till 540 ml avjoniserat/destillerat vatten i 1 enlitersflaska och röres sedan noga. **Observera:** När 10 x tvättbuffertkoncentrat tas från kylförvaring kan olöst salt förekomma. Låt reagensen bli rumstempererad och skaka flaskan för att lösa upp saltet.

2. Kontroller och kalibrator: Centrifugera kontroller och kalibrator vid $10\,000 \times g$ i 10 sekunder före användning så att all vätska samlas i rörets botten. (Före dispensering, om Kontrollerna är märkt för att vara mycket grumlig, har tecken på koagulering eller är svåra att pipett centrifugen en andra gång under 1 minut vid 10.000 rpm.) Dispensera 200 μL provutspädningsvätska i 3 rena provrör eller obelagda mikrotiterplattbrunnar. Tillsätt 10 μL negativ kontroll till ett rör eller en brunn; tillsätt 10 μL positiv kontroll till ett annat rör eller annan brunn; tillsätt 10 μL kalibrator till ett tredje rör eller brunn och blanda noga.
3. Patientprover: Dispensera 200 μL provutspädningsvätska i varje serie rör eller icke belagda mikrotiterplattbrunnar, tillräckligt för det antal prover som ska undersökas. Tillsätt 10 μL av varje prov till motsvarande rör eller brunn och blanda noga.

ANALYSFÖRFARANDE:

Rumstempera alla analysreagenser (19 - 26 °C) innan analysen påbörjas. Alla steg utförs i rumstemperatur (19 - 26 °C).

1. Registrera varje brunns providentitet på det medföljande registreringskortet för att bestämma antalet lister som behövs för att utföra analysen. Tre brunnar behövs för kontroller och kalibrator. En brunn behövs för varje prov.
2. Ta ur mikrotiterplatttramen som innehåller mikrotiterplattlisterna från foliepåsen. Ta bort de mikrotiterplattlistor som inte behövs från ramen och återförsegl dem i foliepåsen med torkmedel. Mikrotiterplatttramen ska bevaras efter avslutad analys för att användas med återstående mikrotiterplattlistor.
3. Tillsätt 100 μL utspädd positiv kontroll till en mikrotiterplattbrunn, 100 μL utspädd negativ kontroll till en annan mikrotiterplattbrunn och 100 μL utspädd kalibrator till en tredje mikrotiterplattbrunn.
4. Tillsätt 100 μL av varje utspädd patientprov till mikrotiterplattbrunnar.
5. Odlas i 30 minuter.
6. Sug brunnarna. Om en manuell eller halvautomatisk tvättmaskin används, ska tvätt göras tre gånger på följande sätt. Dispensera cirka 300 μL 1 x tvättbuffert i varje brunn och sug sedan. Fyll åter brunnarna med cirka 300 μL av 1 x tvättbuffert och sug en andra gång. Fyll brunnarna med 300 μL av 1 x tvättbuffert och sug en tredje gång. Kontrollera att alla brunnar har sugits efter det tredje (sista) tvättsteget. (Om en automatisk plattdiskmaskin används, ska tvätt göras fyra gånger och varje tvätt innehålla 300 – 350 μL av 1 x tvättbuffert.) Efter den sista tvätten i såväl manuell som automatisk tvätt täcks plattan med absorberande handdukar för att all kvarvarande vätska ska sugas upp.
7. Dispensera 100 μL konjugat i varje brunn.
8. Odlas i 20 minuter.
9. Sug brunnarna. Tvätta brunnarna med 1 x tvättbuffert som i steg 6 ovan.
10. Efter sista tvätten täcks plattan med absorberande handdukar så att kvarvarande vätska sugas upp.
11. Dispensera 100 μL substrat i varje brunn.
12. Odlas i 4 minuter. Vänligen observera: Optimalt analysutförande kräver exakt tidtagning av substratodlingssteget. Tidtagning ska ske från det att den första brunnen fylls med tillsats.
13. Dispensera 100 μL stopplösning i varje brunn i samma ordning som substratet dispenserades i föregående steg. Täck plattan försiktigt och blanda brunnarnas innehåll. Avläs absorptionsvärden inom 5 minuter
14. Avläs absorptionsvärden vid 450 nm med ett referensfilter på 650 nm med en ELISA-plattläsare. Om läsaren inte har ett filter på 650 nm, kan man använda ett alternativt filter på mellan 590 - 650 nm och få likvärdiga resultat.

KVALITETSKONTROLL:

1. Kontrollvärden måste ligga inom följande områden för att analysen ska anses vara giltig:
2. Negativ kontroll $A_{450-650\text{nm}}$ måste vara $< 0,18$.
3. Kalibrator $A_{450-650\text{nm}}$ måste vara $< 0,18$.
4. Positiv kontroll $A_{450-650\text{nm}}$ måste vara $< 1,2$.
5. Om något kontrollvärde för $A_{450-650\text{nm}}$ inte ligger inom områdena ovan ska analysen göras om.

BERÄKNINGAR:

1. Beräkna brytpunktsvärdet för analysen genom att addera 0,3 till kalibrators absorptionsvärde.
2. Beräkna indexvärde för Lyme borrelios (LI) för varje patientprov genom att dividera provets $A_{450-650\text{nm}}$ med brytpunktsvärdet.

TOLKNING AV RESULTATEN:

| <u>Lyme borrelios-index</u> | <u>Tolkning</u> |
|-----------------------------|--|
| $\leq 0,90$ | Negativt resultat. Ingen antikropp för C6-peptid detekterad i föreliggande analys. Resultatet utesluter inte möjligheten av <i>B. burgdorferi</i> s.l.-infektion och om tidig Lyme borrelios misstänks ska ett prov tas 2 - 4 veckor senare och undersökas på nytt. |
| 0,91 - 1,09 | Tvetydigt resultat. Den inexacthet som är inherent i alla metoder innebär en lägre grad av tilltro till tolkningen av prover med $A_{450-650\text{nm}}$ -värden som ligger mycket nära beräknat brytpunktsvärde. Därför har en kategori benämns som tvetydig. Prover som ger tvetydiga resultat ska undersökas på nytt. Om en ny undersökning ger ett tvetydigt resultat ska ett nytt serumpreparat erhållas och undersökas. |
| $\geq 1,10$ | Positivt resultat. Antikropp till C6-peptid upptäckt i föreliggande analys. |

Brytpunkten beräknas för varje analyskörning genom att addera 0,3 till kalibratorns absorptionsvärde. På så vis avses brytpunkten kompensera för analysvariationer från körning till körning, vilket annars skulle kunna påverka känslighet och specificitet. Kalibratorn är utformad för att ge ett absorptionsvärde som reflekterar bakgrundsreaktivitet från normala sera.

BEGRÄNSNINGAR:

1. Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten för *B. burgdorferi* s.l.-infektion. Patienter i tidigt stadium av Lyme borrelios och de som behandlats med antibiotika visar eventuellt inga spårbara antikroppstitrar. Patienter med sjukdomshistoria, tecken eller symtom som tyder på Lyme borrelios ska undersökas igen inom 2 - 4 veckor om det första undersökningsresultatet är negativt.
2. Ett positivt resultat är inget definitivt bevis för *B. burgdorferi* s.l.-infektion. Möjligheten finns att andra sjukdomstillstånd kan producera artificiell reaktivitet i analysen.
3. Analysen ska inte användas för att screena befolkningen i allmänhet. Analysens prediktiva värde är en funktion av förundersökningens sannolikhet för Lyme borrelios i den undersökta befolkningen. Därför ska endast patienter med sjukdomshistoria, kliniska symtom på Lyme borrelios eller som misstänks vara utsatta för smitta av *B. burgdorferi* s.l. undersökas.
4. Hemolyserade, lipemiska, bilirubinemiska eller grumliga prover kan producera artificiella analysresultat. Ett nytt prov ska tas och undersökas.
5. Även särskild utbildning behövs inte, optimal prestanda kräver strikt fasthållande av analysförfarandet som beskrivs i bipacksedeln. Avvikelser från förfarandet kan orsaka avvikande resultat.
6. Falska positiva resultat kan erhållas med sera från patienter med andra sjukdomar än Lyme borrelios, inklusive syfilis, parodontit, reumatisk artrit, systemisk lupus erythematosus och andra autoimmuna infektiösa sjukdomar.

PRESTANDAEGENSKAPER:

Prestanda för kitet C6 Lyme ELISA™ jämfördes med dubbelt protokoll rekommenderat av CDC¹² (det amerikanska smittskyddsinstitutet) (prover som befanns vara positiva eller tvetydiga i ELISA undersöks igen med IgG och IgM Western Blot för att bestämma slutgiltigt resultat) avseende specificitet, känslighet och detektion.

SPECIFICITET:

Serumpreparat erhöles från 1 842 normala blodgivare bestående av 1 329 sera från individer boende i regioner endemiska för Lyme borrelios (nordöstra USA) och 513 sera från individer boende i områden som anses som icke-endemiska för Lyme borrelios (sydvästra USA). Sera undersöktes med kitet C6 Lyme ELISA™ och genom ett dubbelt protokoll med hjälp av en helcellssonikat-ELISA i det första steget (Tabell 1). Specificitet för kitet C6 Lyme ELISA™ var statistiskt likvärdig med det från det dubbla protokollet för såväl friska blodgivare från endemiska som icke-endemiska områden ($p > 0,05$).

Se Bilaga: Tabell 1. Reaktivitet hos blodgivare från endemiska och icke-endemiska områden

KÄNSLIGHET:

Totalt 517 välkarakteriserade serumprover erhöles från nordamerikanska patienter som fått diagnosen Lyme borrelios antingen baserat på (1) dokumenterad erythema migrans; (2) odling eller PCR-positiv för *B. burgdorferi*; (3) borreliaartrit eller andra symtom på spridd Lyme borrelios. Positiv serologi var inget kriterium för att ingå i gruppen.

Kitet C6 Lyme ELISA™ utvärderades i jämförelse med det dubbla protokollet för Lyme-patientgruppen. Generellt detekterade C6 Lyme ELISA™ 74,9 % av lymepatienterna, jämfört med 55,3 % som befanns vara positiva av det dubbla protokollet (Tabell 2 och 3). Känsligheten för C6 Lyme ELISA™ kontra dubbelt protokoll för detektion av lymepatienter med positiv odling visas i Tabell 3.

Se Bilaga: Tabell 2. C6 Lyme ELISA™ kontra dubbelt protokoll

Se Bilaga: Tabell 3. Känslighet utifrån kriterier för provdefinition

Känslighet för kitet C6 Lyme ELISA™ för detektion av antikroppar till *B. burgdorferi* i sera från lymepatienter utvärderades även avseende symptomkategori. En jämförelse av känslighet i C6 Lyme ELISA™ och det dubbla protokollet visas i Tabell 4.

Se Bilaga: Tabell 4. Känslighet utifrån symptomkategori

Lymepatientprover, som skiktats efter tid efter insjuknande, undersöktes med kitet C6 Lyme ELISA™ kontra det dubbla protokollet enligt vad som visas i Tabell 5.

Se Bilaga: Tabell 5. Känslighet utifrån tid efter insjuknande

En reaktivitetsanalys i undergruppen för IgG och IgM Western Blot-positiva lymepatienter visade att 100 % av patienter med positiv IgG Western Blot ($n = 157$) och 95,8 % av patienter med positiv IgM Western Blot ($n = 192$) även var positiva med C6 Lyme ELISA™ (Tabell 6). Omvänt var 47,5 % av patienter positiva med C6 Lyme ELISA™ ($n = 387$) positiva med IgM Western Blot, och 40,7 % ($n = 386$) var positiva med IgG Western Blot.

Se Bilaga: Tabell 6. Resultat för C6 Lyme ELISA™ kontra Western Blot

RESULTAT FRÅN PROSPEKTIV STUDIE:

En prospektiv studie genomfördes på 1 276 serumprover som mottogs seriellt vid två referenslaboratorier för screeningsundersökningar av Lyme. Sera undersöktes med kitet C6 Lyme ELISA™ och med det dubbla protokollet (Tabell 7). Överensstämmande resultat förekom i 98,5 % av de preparat som undersöktes.

Se Bilaga: Tabell 7. Prospektiva prover: Resultat för C6 Lyme ELISA™ kontra dubbelt protokoll

KORSREAKTIVA TILLSTÅND:

Sera från 366 individer med andra sjukdomstillstånd än Lyme borrelios undersöktes för korsreaktivitet i C6 Lyme ELISA™. I Tabell 8 redovisas resultaten för sjutton av tillstånden. Två sera befanns vara positiva med både C6 ELISA och dubbelt protokoll, medan ytterligare ett serum endast var positivt med dubbelt protokoll (Tabell 9). C6 Lyme ELISA™ visade en generell specificitet på 99,5 % i alla kategorier.

Se Bilaga: Tabell 8. Korsreaktiva tillstånd: Resultat för C6 Lyme ELISA™

Se Bilaga: Tabell 9. Korsreaktiva tillstånd: C6 Lyme ELISA™ kontra dubbelt protokoll

REPRODUCERBARHET:

Reproducerbarhet undersöktes på en panel av 8 preparat, inklusive kitet positiva och negativa kontroller och 6 preparat varav 2 negativa, 2 svagt reaktiva och 2 positiva sera. Reproducerbarheten bedömdes i fyra analyser: intra-assay, inter-assay, inter-lot, och inter-site. Resultatet från var och en av dessa analyser sammanfattas i följande tabell.

Se Bilaga: Tabell 10. Reproducerbarhet: Resultat för C6 Lyme ELISA™

IMMUNETICS, INC. KONTAKTINFORMATION:

Immunitics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tel.: 800-227-4765 or +1 617-896-9100
Fax: +1 617-896-9110
Epost: info@immunitics.com

AUKTORISERAD REPRESENTANT FÖR EUROPA:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussels, BELGIEN
Tel: (32) 2.732.59.54
Fax: (32) 2.732.60.03
Epost: mail@obelis.net



Immunetics® C6 Lyme ELISA™ Pakkaus
Luokkanumero: DK-E601-096
96 testiä
In vitro -diagnosointikäyttöön

TIIVISTELMÄ:

Lymen tauti on monielinsairaus, joka aiheutuu infektiosta jollakin spirokeetan *Borrelia burgdorferi sensu lato*^{1,2} kolmesta genotyypistä, jotka ovat *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, and *B. afzelii*. Tauti leviää Yhdysvalloissa³⁻⁵, Euroopassa⁶, Venäjällä ja muissa Aasian maissa esiintyvien *Ixodes*-puutiaislajien pureman kautta.

Lymen tauti aiheuttaa joukon kliinisiä oireita^{2,7} sen edetessä vaiheesta toiseen. Tulehduksen ensimmäinen merkki (alkuvaihe) on puremakohtaan ilmestyvä kehämäinen erythema migrans -ihottuma. Se ilmenee 60 - 80:llä prosentilla potilaista muutaman päivän tai viikon kuluessa ensi-infektiosta. Yleiset vilustumisoireiden kaltaiset oireet (päänsärky, vatsakipu ja väsymys) ovat yleisiä ihottuman aikana tai sen jälkeen. Viikkojen tai kuukausien kuluttua tauti etenee toiseen vaiheeseen. Tälle toiselle vaiheelle ovat yleensä ominaisia muskuloskeletaalin kipua tai niveltulehdus, neurologiset häiriöt ja/tai sydänkomplikaatiot. Lyhyet artriittiset kohtaukset suurissa nivelissä muuttuvat ajan myötä pysyviksi ja niistä saattaa kehittyä krooninen tila infektion myöhemmässä vaiheessa (kolmas vaihe). Muihin infektion myöhäisessä vaiheessa ilmeneviin oireisiin sisältyvät surkastuttava ihotulehdus (acrodermatitis chronica atrophicans), ihovaurio ja erilaiset neuroborrelioosiin liittyvät neurologiset häiriöt.

Serologinen testaus on osoittautunut diagnoosin ohella hyödylliseksi sen havaitsemisessa, miten vasta-aine reagoi *Borrelia burgdorferi* -spirokeettaan. Useimmilla Lyme-potilailla vasta-aineen reaktio spiroketaaliin antigeeneihin voidaan havaita viikkojen sisällä infektiosta. Reaktion herkkyys ja tarkkuus sekä ajan kulku ja vasta-aineen luokka vaihtelevat antigeenin mukaan.

Immunetics® C6 Lyme ELISA™ -pakkauksessa käytetty antigeeni on synteettinen peptidi (C6-peptidi*). Se on johdettu VlsE-proteiinista, jonka on osoitettu olevan sekä spesifinen että erittäin immunogeeninen¹³⁻²⁰. Peptidisekvenssi säilyy ja se on yhtäläisesti antigeeninen ihmisillä, joilla on *Borrelia burgdorferin* (suppeassa mielessä) tai eurooppalaisen genotyypin aiheuttama infektio, *Borrelia afzelii* ja *Borrelia garinii*⁶ mukaan luettuina. Koska antigeeni edustaa määriteltyä sekvenssiä proteiinissa, mahdollinen ristiinreaktiivisuus muissa organismeissa olevien vieraiden tai osittain sukuisten antigeenien kanssa vähenee huomattavasti.

*US-patentit 6,475,492, 6,719,983 ja 6,740,744 ja kansainväliset patentit.

PERIAATE:

Immunetics® C6 Lyme ELISA™ -pakkaus perustuu synteettiseen peptidiantigeeniin (C6-peptidi), joka on microwell ELISA -muodossa. Testitoimenpiteessä laimennettuja seeruminäytteitä lisätään antigeenillä pinnoitetun microwell-levyn syvennyksiin, missä niitä inkuboidaan. Seerumissa olevat C6-peptidille spesifit vasta-aineet sitoutuvat immobilisoidulla antigeenillä ja sitomattomat vasta-aineet poistetaan pesuvaiheiden avulla. Sidotut vasta-aineet havaitaan lisäämällä piparjuuriperoksidaasi-konjugoitunutta (HRP) vuohen anti-ihmis IgG/IgM konjugaattia. Sen jälkeen, kun ylimääräinen konjugaatti on poistettu jatkopesuvaiheissa, lisätään kromogeenistä peroksidaasisubstraattia, joka sisältää tetrametyyliibentsidiiniä (TMB). Tuotoksena on sinivihreä tuote syvennyksissä, joissa vasta-aineet ovat sitoutuneet antigeeniin. Värikehitysreaktio jäädytetään lisäämällä laimennettua rikkihappoa, joka saa aikaan keltaisen värinmuutoksen. Sen jälkeen jokaisessa syvennyksessä mitataan ELISA microplate -lukijan avulla optista absorbanssia 450 nm:ssä, korjattuna 590 - 650 nm:n taustavähennyksellä.

TOIMITUKSEEN SISÄLTÄVÄT REAGENSIT:

1. Microwell-levy (osanumero CB-P005-096). 96 syvennystä 12 liuskassa, joista jokaisessa on kahdeksan syvennystä ja jotka säilytetään uudelleensuljettavassa foliopussissa kuivatteen kanssa.
2. Positiivinen verrokki (0,300 ml) (osanumero CB-L018-300). Ihmisperäistä materiaalia Gentamicinin ja ProClinin kanssa on lisätty säilöntäaineina.
3. Negatiivinen verrokki (0,300 ml) (osanumero CB-N023-300). Ihmisperäistä materiaalia Gentamicinin ja ProClinin kanssa on lisätty säilöntäaineina.
4. Raja-arvon kalibroija (0,300 ml) (osanumero CB-N030-300). Ihmisperäistä materiaalia Gentamicinin ja ProClinin kanssa on lisätty säilöntäaineina. Käytetään testin raja-arvon kalibroimiseksi.
5. Konjugaatti (15 ml) (osanumero CB-A028-015). Käyttövalmis vuohen anti-ihmis IgG/IgM piparjuuriperoksidaasi (HRP) -konjugaatti.
6. Näytteen laimennusaine (30 ml) (osanumero CC-S004-030). Käyttövalmis laimennuspuskuri, joka sisältää Gentamicinia ja ProClinia säilöntäaineina.
7. TMB ELISA -substraatti (15 ml) (osanumero CC-S003-015). Käyttövalmis liuos, joka sisältää vetyperoksidia ja TMB:tä.

- 10X-pesupuskurikonsentraatti (60 ml) (osanumero CC-B001-060). Sisältää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta ja Tween-20-puhdistusainetta säilytysaineena lisätyn ProClinin kanssa.
- Pysäytysliuos (15 ml) (osanumero CC-S005-015). Käyttövalmis hapan liuos.

VAROTOIMET:

- Tässä pakkauksessa käytetyt ihmisperäiset materiaalit on testattu FDA:n hyväksymin menetelmin negatiiviksi HIV-1- ja HIV-2-vasta-aineille, hepatiitti-C- ja hepatiitti-B-pinta-antigeenille. Koska mitkään testimenetelmät eivät voi kuitenkaan antaa täydellistä varmuutta siitä, ettei näitä tartunnanaiheuttajia ole, kaikkia verrokkeja ja testinäytteitä tulee käsitellä ikään kuin ne pystyisivät levittämään tartunnanaiheuttajia. Niitä on pidettävä mahdollisesti tartunnanvaarallisina materiaaleina ja niiden käsittelyssä tulee noudattaa bioturvallisuustasoa 2 siten kuin CDC:n/Kansallisten terveystieteiden oppaassa "*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th Edition", 1999 suositellaan.
- Käytä asianmukaisia henkilösuojaimia suorittaessasi testin. Älä anna reagenssien päästä iholle, silmiin tai suuhun, sillä ärsytystä saattaa seurata. Kontaktin sattuessa pese huolellisesti vedellä. Älä pipetoi reagensseja suulla.
- Sulje verrokki ja kalibroija tiukasti käytön jälkeen haihtumisen minimoimiseksi.
- Pysäytysliuos sisältää rikkihappoa. Jätteet, jotka sisältävät pysäytysliuosta, tulee tehdä pH-neutraaleiksi ennen hävittämistä. Huomio: natriumhypokloriitin (valkaisuaine) lisääminen liuoksiin, jotka sisältävät rikkihappoa, tuottaa myrkyllistä kloorikaasua.
- Käytä jokaisen näytteen ja reagenssin pipetoinnissa uusia pipetinkärkiä. Pipetinkärkien uudelleenkäytöstä saattaa aiheutua kontaminaatio.
- Hävitä käytetyt testireagenssit ja näytteet asianmukaisten biologisesti vaarallisia aineita koskevien menettelyjen mukaisesti.
- Älä sekoita reagensseja, jotka tulevat eri eränumeroilla varustetuista pakkauksista. Älä käytä pakkauksen ainesosia etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Pakkauksen kaikki ainesosat on saatettava huoneenlämpöiseksi (19 – 26 °C) ennen testin aloittamista.
- TMB ELISA -substraatti on herkkä valolle ja metalli-ioneille. Vältä altistumista valolle ja metalli-ioneille.
- Käytä vain tislattua tai deionoitua vettä puskureiden valmisteluun testissä.
- Käytä käsiaineita käsitellessäsi microwell-levyliuskoja.
- Nouda pakkauksen mukana tulleessa tuotetiedotteessa olevia ohjeita testin optimaalista, toistettavaa ja tarkkaa suorittamista varten. Tiedotteessa esitetyistä ohjeista poikkeaminen saattaa johtaa vääriin tuloksiin.
- Älä esipese syvänteitä pesupuskurilla tai näytteen laimennusaineella.
- Älä sekoita TMB ELISA -substraatin ja konjugaatin pullonkorkkeja.

TARVITTAVAT EI MUKANA TOIMITETUT MATERIAALIT:

- Mittalasi nesteeseen mittaukseen
- 1 litran pullo pesupuskuria
- Pipetointilaitteet 10 - 200 µl:n annosteluun (suositellaan monikanavaista pipetointilaitetta tai 10 µl:n, 100 µl:n ja 200 µl:n pipettejä)
- Pinnoittamaton microwell-levy tai testiputket näytelaimennusta varten
- Tislattua tai deionisoitua vettä
- Ajastin (0 – 60 minuuttia)
- ELISA-lukija 450 nm:n suodattimella ja 590 – 650 nm:n vertailusuodattimella
- Tyhjiömuri tai hävittämiskeino testiliuosia varten (suositellaan monikanavaista imuria)
- Imukykyisiä pyyhkeitä
- Linko, jonka suorituskyky on 10 000 kierrosta minuutissa

LISÄVARUSTEET:

- Automaattinen levypesuri

REAGENSIN VARASTOINTI JA SÄILYVYYSAIKA:

- Säilytä avaamaton pakkaus 2 – 8 °C:ssa. Viimeinen käyttöpäivämäärä on merkitty pakkauksen etikettiin.
- Käyttämättömät mikrolevyliuskat tulee säilyttää 2 – 8 °C:ssa suljettuina alkuperäisiin foliopusseihin kuivikkeen kanssa.
- Pakkauksen ainesosat, joihin sisältyvät verrokki, kalibroija, HRP-konjugaatti, substraatti, pysäytysliuos, näytteen laimennusaine ja 10X-pesupuskurikonsentraatti, tulee säilyttää 2 – 8 °C:ssa.
- 1X (käyvä) pesupuskuriliuosta voidaan varastoida huoneenlämpötilassa (19 – 26 °C) enintään 30 päivää.
- TMB ELISA -substraatti tulee säilyttää valolta suojaavissa pulloissa, jotka eivät sisällä metalli-ioneja. Substraatin säilyvyysaika perustuu säilytykseen muovisessa meripihkan värisessä pullossa, joka tulee pakkauksen mukana.
- Älä käytä pakkauksen ainesosia viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.

NÄYTTEIDEN KERÄÄMINEN:

- Tuoreet ihmisen seerumin näytteet tulee kerätä ja joko säilyttää 2 – 8 °C:ssa, jos testi suoritetaan 10 päivän kuluessa, tai pakastaa.
- Hemolysoidyt tai lipeemiset seerumit ja seerumit, jotka läpikäyvät monia jäädytys-sulatus-jaksoja, saattavat tuottaa anomaaleja tuloksia.
- Linkoa seerumeja mikrolingossa yhden minuutin ajan nopeudella 10 000 kierrosta minuutissa mahdollisten näkyvien saostumien poistamiseksi ennen testiä.

4. Älä testaa näytteitä, joissa näkyy viitteitä mikrobikontaminaatiosta.
5. Testi on tarkoitettu käytettäväksi ihmisen seerumin kanssa. Plasman käyttöä tämän testin kanssa ei ole tutkittu.

REAGENSIN, VERROKIN, KALIBROIJAN JA NÄYTTEEN PREPARAATIO:

1. 1X-pesupuskuri: preparoi kerran lisäämällä 60 ml 10X-pesupuskurikonsentraattia 540 ml: aan deionisoitua/tislattua vettä yhden litran pullossa ja sekoittamalla huolellisesti. **Huomautus:** Kun 10X-pesupuskurikonsentraatti poistetaan jäädytyksestä, liukenemattomia suoloja saattaa esiintyä. Anna reagenssin lämmetä huoneenlämpötilaan ja ravista pulloa, jotta suolat liukenevat.
2. Verrokkit ja kalibroija: Linkoa ennen käyttöä verrokkeja ja kalibroijaa nopeudella 10 000 × g 10 sekunnin ajan kaiken tuubin pohjassa olevan nesteen saostamiseksi. (Jos ennen annostelua verrokkien huomataan olevan liian läpinäkymättömiä, niissä on viitteitä koaguloitumisesta tai niiden pipetointi on hankalaa, linkoa toisen kerran yhden minuutin ajan nopeudella 10 000 kierrosta minuutissa.) Annostele 200 µl näytteen laimennusainetta kolmeen puhtaaseen koeputkeen tai pinnoittamattoman microplaten syvennyksiin. Lisää 10 µl negatiivista verrokkia yhteen putkeen tai syvennykseen; lisää 10 µl positiivista verrokkia toiseen putkeen tai syvennykseen; lisää 10 µl kalibroijaa kolmanteen putkeen tai syvennykseen ja sekoita huolellisesti.
3. Potilasnäytteet: Annostele 200 µl näytteen laimennusainetta jokaiseen putkeen tai pinnoittamattoman microplaten syvennykseen riittävästi testattavien näytteiden määrää varten. Lisää 10 µl kutakin näytettä vastaavaan putkeen tai syvennykseen ja sekoita huolellisesti.

TESTIMENETELMÄ:

Anna kaikkien testireagenssien lämmetä huoneenlämpötilaan (19 – 26 °C) ennen testin aloittamista. Kaikki vaiheet suoritetaan huoneenlämpötilassa (19 – 26 °C).

1. Merkitse ylös näytteen tunniste kunkin syvennyksen osalta mukana tulleeseen asiakirjaan määrittääksesi testin suorittamista varten tarvittavien liuskojen määrän. Verrokkeja ja kalibroijaa varten tarvitaan kolme syvennystä. Kutakin näytettä varten tarvitaan yksi syvennys.
2. Poista levykehys, joka sisältää levyliuskat, foliopussista. Poista tarpeettomat levyliuskat kehyksestä ja sulje käyttämättömät liuskat foliopussiin kuivikkeen kanssa. Levykehys tulee säilyttää testin päätyttyä jäljelle jääneiden levyliuskojen kanssa käyttöä varten.
3. Lisää 100 µl laimennettua positiivista verrokkia yhteen syvennykseen; 100 µl laimennettua negatiivista verrokkia toiseen syvennykseen ja 100 µl laimennettua kalibroijaa kolmanteen putkeen tai syvennykseen.
4. Lisää 100 µl kutakin laimennettua potilasnäytettä syvennyksiin.
5. Inkuboi 30 minuutin ajan.
6. Aspiroi syvennykset. Jos käytetään manuaalista tai puoliautomaattista pesusarjaa, pese kolme kertaa seuraavasti. Annostele noin 300 µl 1X-pesupuskuria jokaiseen syvennykseen ja aspiroi sen jälkeen. Täytä syvennykset noin 300:lla µl:lla 1X-pesupuskuria ja aspiroi toisen kerran. Täytä syvennykset 300:lla µl:lla 1X-pesupuskuria ja aspiroi kolmannen kerran. Varmista, että kaikki syvennykset on aspiroitu kolmannen (viimeisen) pesuvaiheen jälkeen. (Jos käytetään automaattista levypesuria, pese neljä kertaa joka kerralla 300 - 350 µl:lla 1X-pesupuskuria.) Taputtele levyä imukykyisille pyyhkeille viimeisen manuaalisen ja automaattisen pesukerran jälkeen kaikkien nestejäämien poistamiseksi.
7. Annostele 100 µl konjugaattia jokaiseen syvennykseen.
8. Inkuboi 20 minuutin ajan.
9. Aspiroi syvennykset. Pese syvennykset 1X-pesupuskurilla kuten edellä vaiheessa 6.
10. Taputtele levyä imukykyisille pyyhkeille viimeisen pesukerran jälkeen kaikkien nestejäämien poistamiseksi.
11. Annostele 100 µl substraattia jokaiseen syvennykseen.
12. Inkuboi neljän minuutin ajan. Huomio: testin optimaalinen suorittaminen edellyttää täsmällistä ajanottoa substraatin inkubointivaiheessa ja aika tulee laskea siitä lähtien, kun ensimmäiseen syvennykseen tehdään lisäys.
13. Annostele 100 µl pysäytysliuosta jokaiseen syvennykseen samassa järjestyksessä kuin substraattia annosteltiin edellisessä vaiheessa. Taputtele levyä kevyesti syvennyksien sisältöjen sekoittamiseksi. Lue absorbanssiarvot viiden minuutin kuluessa.
14. Lue absorbanssi 450 nm:ssä 650 nm:n vertailusuodattimella käyttämällä ELISA-levylukijaa. Jos lukijaa ei ole varustettu 650 nm:n suodattimella, vaihtoehtoista 590 - 650 nm:n suodatinta käyttämällä saadaan vastaavia tuloksia.

LAADUNVALVONTA:

1. Verrokkien arvojen on oltava seuraavilla alueilla, jotta testin voidaan pitää pätevänä:
2. Negatiivisen verrokin $A_{450-650nm}$ on oltava $<0,18$.
3. Kalibroijan $A_{450-650nm}$ on oltava $<0,18$.
4. Positiivisen verrokin $A_{450-650nm}$ on oltava $>1,2$.
5. Jos jonkin verrokin $A_{450-650nm}$ arvo ei ole edellä mainituilla alueilla, testi tulee toistaa.

LASKELMAT:

1. Laske testin raja-arvo lisäämällä 0,3 kalibroijan absorbanssiarvoon.
2. Laske Lyme-indeksin arvo (LI) kullekin potilasnäytteelle jakamalla näytteen $A_{450-650nm}$ raja-arvolla.

TULOSTEN TULKITSEMINEN:

Lyme-indeksi

Tulkinta

≤ 0,90

Negatiivinen tulos. Asianomaisessa testissä ei havaittu vasta-ainetta C6-peptidille. Tämä tulos ei poissulje *Borrelia burgdorferi* s.l. -infektion mahdollisuutta, ja mikäli varhaista Lymen tautia epäillään, toinen näyte tulisi ottaa 2 - 4 viikkoa myöhemmin ja testata uudelleen.

0,91 – 1,09

Monitulkintainen tulos. Kaikille menetelmille luontainen epävarmuus merkitsee alhaisempaa luotettavuusastetta sellaisten näytteiden tulkinnessa, joiden $A_{450-650nm}$ -arvot ovat hyvin lähellä laskettua raja-arvoa. Tästä syystä nimettiin monitulkintainen luokka. Näytteet, joiden tuottamat tulokset ovat monitulkintaisia, on testattava uudelleen. Jos uudelleentestaus tuottaa monitulkintaisen tuloksen, on otettava uusi seeruminäyte ja testattava se.

≥ 1,10

Positiivinen tulos. Asianomaisessa testissä havaittiin vasta-ainetta C6-peptidille.

Raja-arvo määritetään kullekin suoritettulle testille lisäämällä 0,3 kalibroijan absorbanssiarvoon. Tällä tavalla raja-arvo on tarkoitettu kompensoimaan testien välisiä eroja, jotka saattaisivat muuten vaikuttaa herkkyyteen ja tarkkuuteen. Kalibroija on suunniteltu tuottamaan absorbanssiarvon, joka kuvastaa normaalin seerumin taustareaktiivisuutta.

RAJOITUKSET:

1. Negatiivinen tulos ei poissulje *Borrelia burgdorferi* s.l. -infektion mahdollisuutta. Potilailla, joilla Lymen tauti on alkuvaiheissaan tai potilailla, joita on hoidettu antibiooteilla, ei välttämättä ilmene havaittavissa olevia vasta-ainetitterejä. Potilaat, joilla kliiniset esitiedot, merkit tai oireet viittaavat Lymen tautiin, tulee testata uudelleen 2 - 4 viikon kuluttua, jos ensimmäisen testin tulos on negatiivinen.
2. Positiivinen tulos ei ole lopullinen näyttö *Borrelia burgdorferi* s.l. -infektiosta. On mahdollista, että muut tautitilat saattavat tuottaa testissä artefaktuaalista reaktiivisuutta.
3. Tätä testiä ei tule käyttää koko väestön seulontaan. Testin ennakoiva arvo on Lymen taudin todennäköisyyttä testatussa väestössä koskevan ennakkotestin funktio. Siksi testi tulee tehdä vain potilailla, joilla on Lymen taudin kliinisiä oireita tai joiden epäillään altistuneen *Borrelia burgdorferi* s.l. -spirokeetalle.
4. Hemolysoidut, lipeemiset, bilirubiiniset tai sameat näytteet saattavat tuottaa artefaktuaalisia testituloksia. Uudelleentestausta varten on otettava tuore näyte.
5. Vaikka erityinen koulutus ei ole tarpeen, optimaalinen toimivuus edellyttää, että tiedotteessa kuvailtua testitoimenpidettä noudatetaan tarkasti. Toimenpiteestä poikkeaminen saattaa johtaa vääristyneisiin tuloksiin.
6. Epätosia positiivisia tuloksia saatetaan saada seerumilla, joka on peräisin potilailta, joilla on muita tauteja kuin Lymen tauti, kuten kuppa, periodontaalinen sairaus, nivelreuma, systeeminen lupus erythematosus tai muu autoimmuunisairaus tai tartuntatauti.

SUORITUSOMINAISUUDET:

C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen suorituskykyä havaitsemistarkkuudessa ja -herkkyydessä verrattiin CDC¹² suosittelman kaksitasoisen protokollan suorituskykyyn (ELISAlla positiivisiksi tai monitulkintaisiksi todetut näytteet testataan uudelleen IgG:llä ja IgM Western Blotilla lopullisen tuloksen määrittämiseksi).

TARKKUUS:

Seeruminäytteet otettiin 1 842 normaaliilta verenluovuttajalta, ja näytteistä 1 329 seerumia oli henkilöiltä, joiden asuinalueille Lymen tauti on ominainen (Yhdysvaltojen koillisosat) ja 513 seerumia henkilöiltä, joiden asuinalueille Lymen tautia ei pidetä ominaisena (Yhdysvaltojen lounaisosat). Seerumit testattiin C6 Lyme ELISA™ -pakkauksella ja kaksitasoisella protokollalla käyttämällä koko solun ääniaaltolaitetta ELISA ensimmäisessä vaiheessa (taulukko 1). C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen tarkkuus oli tilastollisesti vastaava kaksitasoiseen protokollaan nähden sekä endeemisten että ei-endeemisten terveiden verenluovuttajien osalta (p>0,05).

Katso liitettä: Taulukko 1. Reaktiivisuus endeemisissä ja ei-endeemisissä verenluovuttajissa

HERKKYYS:

Yhteensä 517 hyvin ominaista seeruminäytettä otettiin pohjois-amerikkalaisilta potilailta, joilla oli diagnosoitu Lymen tauti joko (1) dokumentoidun erythema migransin, (2) *Borrelia burgdorferi*lle positiivisen viljelmän tai PCR:n tai (3) Lymen artriitin tai disseminoituneen Lymen taudin muiden oireiden perusteella. Positiivinen serologia ei ollut kriteerinä tähän ryhmään sisällytykselle.

C6 Lyme ELISA™ -pakkausta arvioitiin vertaamalla sitä kaksitasoiseen protokollaan Lyme-potilasryhmällä. C6 Lyme ELISA™ havaitsi kaikkiaan 74,9 % Lyme-potilaista verrattuna 55,3 %:iin potilaita, joilla tehtiin positiivinen löydös kaksitasoisesta protokollalla käyttämällä (taulukot 2 ja 3). C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen herkkyys verrattuna kaksitasoisen protokollan herkkyyteen Lyme-potilaiden, joilla on positiivinen viljelmä, havaitsemisessa esitetään taulukossa 3.

Katso liitettä: Taulukko 2. C6 Lyme ELISA™ vastaan kaksitasoinen protokolla.

Katso liitettä: Taulukko 3. Herkkyys näytteen testikriteerien mukaan

C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen herkkyyttä *Borrelia burgdorferi* -vasta-aineiden havaitsemisessa Lyme-potilaan seerumissa arvioitiin myös oireluokkaan nähden. C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen ja kaksitasoisen protokollan herkkyyksvertailu esitetään taulukossa 4.

Katso liitettä: Taulukko 4. Herkkyys oireluokan mukaan

Lyme-potilaiden näytteitä, joita aika oli stratifioinut sairauden puhkeamisen jälkeen, testattiin C6 Lyme ELISA™ -pakkauksella verrattuna kaksitasoiseen protokollaan siten kuin taulukossa 5 esitetään.

Katso liitettä: Taulukko 5. Herkkyys puhkeamisen jälkeisen ajan mukaan

IgG ja IgM Western Blot -positiivisten Lyme-potilaiden osajoukon reaktiivisuuden analyysi osoitti, että 100 % potilaista, joilla oli positiivinen IgG Western Blot (n=157) ja 95,8 % potilaista, joilla oli positiivinen IgM Western Blot (n=192), olivat positiivisia myös C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen mukaan (taulukko 6). Sitä vastoin 47,5 % potilaista, jotka olivat positiivisia C6 Lyme ELISA™ -pakkauksen mukaan (n=387) olivat positiivisia IgM Western Blotille ja 40,7 % (n=386) olivat positiivisia IgG Western Blotille.

Katso liitettä: Taulukko 6. C6 Lyme ELISA™ vastaan Western Blot -tulokset

MAHDOLLISET TUTKIMUSTULOKSET:

Prospektiivinen tutkimus suoritettiin 1 276 seeruminäytteellä, jotka oli vastaanotettu sarjoina kahdesta vertailulaboratoriosta Lymen seulontatestejä varten. Seerumit testattiin C6 Lyme ELISA™ -pakkauksella ja kaksitasoisella protokollalla (taulukko 7). Yhtäpitävät tulokset löydettiin 98,5 prosentilla testatuista näytteistä.

Katso liitettä: Taulukko 7. Prospektiiviset näytteet: C6 Lyme ELISA™ vastaan kaksitasoiset tulokset

RISTIINREAKTIIVISET TILAT:

Seerumeja 366 henkilöltä, joilla oli muita sairaustiloja kuin Lymen tauti, testattiin ristiinreaktiivisuuden varalta C6 Lyme ELISA™ -testissä. Tulokset 17 tilasta esitetään taulukossa 8. Kaksi seerumia havaittiin positiivisiksi sekä C6 ELISA -testillä että kaksitasoisella protokollalla, kun yksi seerumi lisää oli positiivinen vain kaksitasoisen protokollan mukaan (taulukko 9). C6 Lyme ELISA™ -testin osoittama tarkkuus oli kaikissa luokissa 99,5 %.

Katso liitettä: Taulukko 8. Ristiinreaktiiviset tilat: C6 Lyme ELISA™ -tulokset

Katso liitettä: Taulukko 9. Ristiinreaktiiviset tilat: C6 Lyme ELISA™ vastaan kaksitasoinen protokolla

TOISTETTAVUUS:

Toistettavuutta testattiin paneelissa, jossa oli kahdeksan näytettä. Niihin sisältyivät pakkauksen positiiviset ja negatiiviset verrokki ja kuusi näytettä, jotka olivat kaksi negatiivista, kaksi heikosti reaktiivista ja kaksi positiivista seerumia. Toistettavuutta arvioitiin neljässä testissä: testin sisäinen, testien välinen, erien välinen ja kohtien välinen. Seuraavassa taulukossa esitetään yhteenveto kaikkien näiden analyysien tuloksista.

Katso liitettä: Taulukko 10. Toistettavuus: C6 Lyme ELISA™ -tulokset

IMMUNETICS, INC. YHTEYSTIEDOT:

Immunetics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 Yhdysvallat
Puh. 800-227-4765 tai +1-617-896-9100
Faksi 617-896-9110
Sähköposti: info@immunetics.com

Ota yhteys Immunetics, Inc. -yhtiöön saatavilla olevia kielikäännöksiä varten.

VALTUUTETTU EDUSTAJA EUROOPASSA:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussels, BELGIA
Puh. (32) 2.732.59.54
Faksi (32) 2.732.60.03
Sähköposti: mail@obelis.net



Kit Immunetics® C6 Lyme ELISA™**N. cat: DK-E601-096****96 test****Per uso diagnostico *in vitro*****RIEPILOGO:**

La malattia di Lyme è una malattia multisistemica causata dall'infezione da parte di una delle tre genospecie della Spirocheta *B. burgdorferi sensu lato*^{1,2}, che include *B. burgdorferi*, *B. garinii* e *B. afzelii*. La trasmissione della malattia si verifica a seguito del morso di zecche delle specie *Ixodes*, che si trovano negli Stati Uniti³⁻⁵, in Europa⁶, in Russia e in alcune regioni dell'Asia.

La malattia di Lyme attraversa varie fasi cliniche caratterizzate da una serie di sintomi clinici^{2,7}. La prima manifestazione dell'infezione (fase precoce) è lo sviluppo di una lesione cutanea tondeggianti, denominata Eritema Migrante (EM) in corrispondenza del sito di puntura. Tale evento si manifesta nel 60-80% dei pazienti dopo alcuni giorni o settimane dall'infezione iniziale; in alcuni pazienti tale eruzione non si manifesta oppure è possibile che non venga notata. L'eruzione è spesso accompagnata o seguita da sintomi simil-influenzali (cefalea, dolore addominale e affaticamento). A distanza di alcune settimane o mesi, la malattia progredisce nella fase secondaria, generalmente caratterizzata da dolori muscoloscheletrici o artrite, deficit neurologici e/o complicanze cardiache. Brevi attacchi artrici alle articolazioni maggiori diventano persistenti con il passare del tempo e possono sfociare in una condizione cronica nella fase tardiva della malattia (terzo stadio). Altre manifestazioni sintomatiche dell'ultimo stadio dell'infezione includono l'acrodermatite cronica atrofica, una lesione cutanea e vari disturbi neurologici associati alla neuroborreliosi.

I test sierologici si sono rivelati utili nella determinazione della risposta anticorpale a *B. burgdorferi* di ausilio alla diagnosi. Nella maggior parte dei pazienti affetti dalla malattia di Lyme, è possibile individuare una risposta anticorpale agli antigeni delle Spirochete a settimane di distanza dal momento in cui è avvenuta l'infezione. La sensibilità e la specificità della risposta, nonché i tempi e la classe di anticorpi variano in funzione dell'antigene.

L'antigene utilizzato nel kit Immunetics® C6 Lyme ELISA™ è un peptide sintetico (peptide C6*) derivato dalla proteina VlsE, che si è rivelata specifica e altamente immunogenica¹³⁻²⁰. La sequenza peptidica è conservata e risulta parimenti antigenica negli esseri umani infettati da *Borrelia burgdorferi sensu stricto* o in quelli infettati dalle genospecie europee, inclusi i ceppi *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*¹⁶. Poiché l'antigene rappresenta una sequenza definita all'interno della proteina, la potenziale reattività crociata con antigeni non associati e parzialmente associati presenti in altri organismi è altamente ridotta.

*Brevetti statunitensi 6,475,492, 6,719,983 e 6,740,744 e brevetti internazionali.

PRINCIPIO:

Il kit Immunetics® C6 Lyme ELISA™ si basa su un antigene peptidico sintetico (peptide C6) in formato di micropozzetti ELISA. Nella procedura del test, i campioni di siero diluiti vengono aggiunti e incubati in pozzetti di una piastra di micropozzetti rivestiti con antigene. Gli anticorpi specifici del peptide C6 presenti nel campione di siero si legano all'antigene immobilizzato e gli anticorpi non legati vengono eliminati mediante lavaggi. Gli anticorpi legati vengono rilevati aggiungendo perossidasi di rafano (HRP) coniugata con coniugato IgG/IgM anti-umano di capra. Dopo l'eliminazione del coniugato in eccesso mediante ulteriori lavaggi, viene aggiunto un substrato di perossidasi cromogenica contenente tetrametilbenzidina (TMB). Nei pozzetti in cui gli anticorpi si sono legati all'antigene, viene generato un prodotto blu-verde. La reazione cromatica viene smorzata aggiungendo acido solforico diluito, che produce una virata del colore al giallo. A questo punto si misura l'assorbanza ottica a 450 nm, corretta per sottrazione del fondo a 590-650 nm, in ciascun pozzetto utilizzando un lettore di micropiastre ELISA.

REAGENTI FORNITI:

1. Piastra di micropozzetti (N. parte CB-P005-096). 96 pozzetti, forniti in strisce da 12, ciascuna contenente 8 pozzetti e inserita in un sacchetto in alluminio contenente essiccante.
2. Controllo positivo (0,300 mL) (N. parte CB-L018-300). Materiale di origine umana a cui sono stati aggiunti gentamicina e ProClin come conservanti.
3. Controllo negativo (0,300 mL) (N. parte CB-N023-300). Materiale di origine umana a cui sono stati aggiunti gentamicina e ProClin come conservanti.
4. Calibratore di cutoff (0,300 mL) (N. parte CB-N030-300). Materiale di origine umana a cui sono stati aggiunti gentamicina e ProClin come conservanti. Utilizzato per calibrare il valore di cutoff del test.
5. Coniugato (15 mL) (N. parte CB-A028-015). Coniugato di perossidasi di rafano e IgG/IgM di capra anti-umano pronto all'uso.
6. Diluente per campioni (30 mL) (N. parte CC-S004-030). Tampone diluente contenente gentamicina e ProClin come conservanti.
7. Substrato di TMB ELISA (15 mL) (N. parte CC-S003-015). Soluzione pronta all'uso contenente perossido di idrogeno e TMB.
8. Tampone di lavaggio concentrato 10X (60 mL) (N. parte CC-B001-060). Contiene soluzione salina tamponata con fosfati e detergente Tween-20, con ProClin aggiunto come conservante.
9. Soluzione bloccante (15 mL) (N. parte CC-S005-015). Soluzione acidica pronta all'uso.

PRECAUZIONI:

1. I materiali di origine umana utilizzati in questo kit sono risultati negativi ai test a cui sono stati sottoposti, utilizzando metodi approvati dalla FDA per gli anticorpi di HIV-1 e HIV-2, Epatite C e l'antigene di superficie dell'Epatite B. Tuttavia, poiché nessun metodo di test può garantire con assoluta sicurezza l'assenza degli agenti infettivi, tutti i controlli e i campioni di test devono essere maneggiati come materiali potenzialmente in grado di trasmettere agenti infettivi. Devono essere considerati come materiali potenzialmente infettivi e maneggiati in base al Biorischio di livello 2, come raccomandato nel manuale redatto da CDC/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 4th Edition", 1999.
2. Indossare dispositivi di protezione individuale adeguati durante l'esecuzione del test. Evitare il contatto dei reagenti con occhi, bocca o cute onde evitare irritazioni. In caso di contatto, sciacquare completamente la parte interessata con acqua. Non pipettare i reagenti con la bocca.
3. Dopo l'utilizzo, chiudere ermeticamente con il relativo tappo i controlli e il calibratore per ridurre al minimo l'evaporazione.
4. La soluzione bloccante contiene acido solforico. I rifiuti contenenti tale soluzione devono essere portati a pH neutro prima del relativo smaltimento. Attenzione: l'aggiunta di ipoclorito di sodio (varechina) a soluzioni contenenti acido solforico, sviluppa gas di cloro tossico.
5. Utilizzare punte di pipette nuove per pipettare i singoli campioni e reagenti onde evitare il rischio di contaminazione.
6. Smaltire i reagenti e i campioni di test utilizzando le corrette procedure di biorischio.
7. Non mischiare i reagenti appartenenti a kit con numeri di lotto diversi. Non utilizzare i componenti dei kit oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.
8. Tutti i componenti dei kit devono essere portati a temperatura ambiente (19-26 °C) prima di avviare il test.
9. Il substrato di TMB Elisa è sensibile alla luce e agli ioni di metallo; evitare pertanto l'esposizione a tali agenti.
10. Utilizzare esclusivamente acqua distillata o deionizzata per la preparazione dei tamponi di test.
11. Indossare i guanti quando si maneggiano le strisce della piastra a micropozzetti.
12. Per prestazioni di test ottimali, riproducibili e accurate, seguire le istruzioni fornite nel foglietto illustrativo. La mancata osservanza delle istruzioni fornite può portare a risultati falsati.
13. Non eseguire il prelavaggio dei pozzetti con soluzione tamponata di lavaggio o diluente per campioni.
14. Non scambiare i tappi dei flaconi del substrato TMB ELISA e del coniugato.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI:

1. Cilindri graduati per misurare le soluzioni liquide
2. 1 contenitore da 1 litro per il tampone di lavaggio
3. Pipettrici per la dispensazione di volume da 10 µL a 200 µL (si consiglia una pipettrice multicanale o pipette da 10 µL, 100 µL e 200µL)
4. Piastra a micropozzetti non rivestita o provette per test per la diluizione dei campioni
5. Acqua distillata o deionizzata
6. Timer (0-60 minuti)
7. Lettore ELISA con filtro da 450 nm e un filtro di riferimento da 590-650 nm
8. Aspiratrice o strumenti di smaltimento per le soluzioni del test (si consiglia l'utilizzo di un aspiratore multicanale)
9. Salviette assorbenti
10. Centrifuga in grado di centrifugare a 10.000 giri/min

STRUMENTI OPZIONALI:

1. Lavapiastre automatica

CONSERVAZIONE E DURATA DEI REAGENTI:

1. Conservare il kit senza aprirlo a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit.
2. Le strisce di micropiastre inutilizzate devono essere conservate a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C, sigillate nei sacchetti in alluminio contenenti essiccante.
3. I componenti del kit inclusi controlli, calibratore, coniugato HRP, substrato, soluzione bloccante, diluente per campioni e concentrato di tampone di lavaggio 10X devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
4. Il tampone di lavaggio 1X (di lavoro) può essere conservato a temperatura ambiente (19-26 °C) per un massimo di 30 giorni.
5. Il substrato TMB ELISA deve essere conservato in flaconi protettivi leggeri che non contengano ioni di metallo. La durata del substrato si basa sulla conservazione nel flacone in plastica color ambra fornito con il kit.
6. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza.

RACCOLTA DI CAMPIONI:

1. Una volta raccolti, i campioni di siero umano fresco devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C se si prevede di eseguire il test entro 10 giorni oppure devono essere congelati.
2. I campioni di siero emolizzati o lipemici e i campioni di siero soggetti a cicli ripetuti di congelamento-scongelo possono generare risultati anomali.
3. Centrifugare i campioni di siero per 1 minuto a 10.000 giri/min in una microcentrifuga prima dell'esecuzione del test per eliminare il precipitato visibile.
4. I campioni che evidenziano contaminazione microbica non devono essere sottoposti a test.
5. Il test è destinato all'utilizzo su campioni di siero umano. L'utilizzo del test su plasma non è stato contemplato.

PREPARAZIONE DI REAGENTI, CONTROLLI, CALBRATORE E CAMPIONI:

1. Tampone di lavaggio 1X: per prepararlo una volta, aggiungere 60 mL di tampone di lavaggio concentrato 10X a 540 mL di acqua deionizzata/distillata in un contenitore da 1 litro e agitare energicamente. **Nota:** quando si estrae il tampone di lavaggio 10X dal frigorifero si potrebbe notare la presenza di sali non disciolti. Per discioglierli, lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente, quindi agitare il flacone.
2. Controlli e calibratore: centrifugare i controlli e il calibratore a 10.000 g per 10 secondi prima dell'uso per depositare tutto il liquido sul fondo della provetta (prima di dispensare, se i controlli appaiono eccessivamente torbidi, se evidenziano coaguli o risultano difficili da pipettare, centrifugare una seconda volta per 1 minuto a 10.000 giri/min.) Dispensare 200 µL di diluente per campioni in 3 provette pulite o

nei pozzetti delle micropiastre non rivestiti. Aggiungere 10 µL di controllo negativo in una provetta o un pozzetto; aggiungere 10 µL di controllo positivo in un'altra provetta o un altro pozzetto; aggiungere 10 µL di calibratore a una terza provetta o pozzetto e agitare energicamente.

3. Campioni del paziente: dispensare 200 µL di diluente per campioni in ogni serie di provette o di pozzetti delle micropiastre non rivestiti, in un volume sufficiente per il numero di campioni da sottoporre a test. Aggiungere 10 µL di ciascun campione alla provetta o al pozzetto corrispondente e miscelare energicamente.

PROCEDURA DEL TEST:

Portare tutti i reagenti del test a temperatura ambiente (19-26 °C) prima dell'avvio del test. Tutti i passaggi del test devono essere eseguiti a temperature ambiente (19-26 °C).

1. Registrare i dettagli identificativi del campione per ciascun pozzetto sul registro fornito per determinare il numero di strisce necessarie per eseguire il test. Saranno necessari tre pozzetti per i controlli e il calibratore. Per ciascun campione sarà necessario un pozzetto.
2. Estrarre il telaio della micropiastra contenente le strisce di micropiastra dal sacchetto in alluminio. Rimuovere le strisce di micropiastra non necessarie dal telaio e risigillare le strisce inutilizzate nel sacchetto in alluminio con l'essiccante. Il telaio della micropiastra deve essere conservato alla fine del test per essere utilizzato con le rimanenti strisce di micropiastre.
3. Aggiungere 100 µL di controllo positivo diluito a un micropozzetto, 100 µL di controllo negativo diluito a un altro micropozzetto e 100 µL di calibratore diluito a un terzo micropozzetto.
4. Aggiungere 100 µL di ciascun campione del paziente diluito ai micropozzetti.
5. Incubare per 30 minuti.
6. Aspirare i pozzetti. Se si utilizza un collettore di lavaggio manuale o semi-automatico, lavare tre volte come segue. Dispensare circa 300 µL di tampone di lavaggio 1X in ciascun pozzetto, quindi aspirare. Riempire i pozzetti con circa 300 µL di tampone di lavaggio 1X e aspirare una seconda volta. Riempire i pozzetti con 300 µL di tampone di lavaggio 1X e aspirare una terza volta. Assicurarsi che tutti i pozzetti siano stati aspirati dopo il terzo e ultimo passaggio di lavaggio (se si utilizza un lavapiastre automatico, lavare quattro volte e per ogni lavaggio utilizzare 300-350 µL di tampone di lavaggio 1X). Dopo il lavaggio finale, per la procedura manuale e quella automatica, picchiettare la piastra su salviette assorbenti per rimuovere il liquido residuo.
7. Dispensare 100 µL di coniugato in ciascun pozzetto.
8. Incubare per 20 minuti.
9. Aspirare i pozzetti. Lavare i pozzetti con il tampone di lavaggio 1X come indicato nel passaggio 6 sopra.
10. Dopo il lavaggio finale, picchiettare la piastra su salviette assorbenti per rimuovere il liquido residuo.
11. Dispensare 100 µL di substrato in ciascun pozzetto.
12. Incubare per 4 minuti. Nota: per ottenere prestazioni del test ottimali, è necessario rispettare i tempi del passaggio di incubazione del substrato; i tempi devono essere calcolati a partire dall'aggiunta al primo pozzetto.
13. Dispensare 100 µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto nello stesso ordine con il quale è stato dispensato il substrato al passaggio precedente. Picchiettare delicatamente la piastra per miscelare il contenuto dei pozzetti. Leggere i valori di assorbanza entro 5 minuti.
14. Leggere i valori di assorbanza a 450 nm con un filtro di riferimento di 650 nm utilizzando un lettore ELISA. Se il lettore non è dotato di un filtro da 650 nm, è possibile utilizzare un filtro alternativo da 590-650 nm, che produrrà risultati equivalenti.

CONTROLLO DI QUALITÀ:

1. Affinché il test sia considerato valido, i valori di controllo devono rientrare nei seguenti intervalli:
2. Il controllo negativo $A_{450-650nm}$ deve essere $<0,18$.
3. Il calibratore $A_{450-650nm}$ deve essere $<0,18$.
4. Il controllo positivo $A_{450-650nm}$ deve essere $>1,2$.
5. Se uno qualsiasi dei valori di controllo $A_{450-650nm}$ non rientra negli intervalli indicati sopra, il test dovrà essere ripetuto.

CALCOLI:

1. Calcolare il valore di cutoff del test aggiungendo 0,3 al valore di assorbanza del calibratore.
2. Calcolare il valore dell'indice di Lyme (LI) per ciascun campione del paziente dividendo il valore $A_{450-650nm}$ del campione per il valore di cutoff.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI:

| <u>Indice di Lyme</u> | <u>Interpretazione</u> |
|-----------------------|--|
| $\leq 0,90$ | Risultato negativo. Non sono stati rilevati anticorpi per il peptide C6 nel presente test. Questo risultato non esclude la possibilità di un'infezione da <i>B. burgdorferi s.l.</i> e, se si sospetta che il paziente sia affetto dalla malattia di Lyme, è opportuno prelevare un secondo campione dopo 2-4 settimane e ripetere il test. |
| 0,91-1,09 | Risultato equivoco. L'imprecisione intrinseca a qualsiasi metodo implica un minore grado di affidabilità nell'interpretazione dei campioni in presenza di valori $A_{450-650nm}$ molto vicini al valore di cutoff calcolato. Per questo motivo, è stata individuata una categoria di risultati equivoci. I campioni che danno luogo a risultati equivoci devono essere sottoposti nuovamente al test. Se ancora i risultati ottenuti risultano equivoci, sarà necessario raccogliere un altro campione di siero e sottoporlo nuovamente al test. |
| $\geq 1,10$ | Risultato positivo. Sono stati rilevati anticorpi per il peptide C6 nel presente test. |

Il valore di cutoff viene determinato per ciascun test eseguito aggiungendo 0,3 al valore di assorbanza del calibratore. In questo modo, il valore di cutoff può compensare le variazioni del test tra una serie e l'altra, che influenzerebbero altrimenti la sensibilità e la specificità del test. Il calibratore è stato progettato per generare un valore di assorbanza che rifletta la reattività di fondo del siero normale.

LIMITI:

1. Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione da *B. burgdorferi s.l.* I pazienti affetti da malattia di Lyme allo stadio iniziale e quelli sottoposti a trattamento antibiotico potrebbero non presentare livelli di anticorpi rilevabili. I pazienti con storia clinica, segni o sintomi riconducibili alla malattia di Lyme devono essere sottoposti a nuovo test dopo 2-4 settimane nel caso in cui il risultato del primo test sia negativo.
2. Un risultato positivo non è necessariamente indicativo di infezione da *B. burgdorferi s.l.* È possibile che altre condizioni patologiche possano generare una reattività equivoca nel test.
3. Questo test non deve essere utilizzato per lo screening della popolazione generale. Il valore predittivo del test è in funzione della probabilità, precedente al test, di manifestazione della malattia di Lyme nella popolazione sottoposta a test. Pertanto, solo i pazienti che manifestano i sintomi clinici della malattia di Lyme o per i quali si sospetti un'esposizione a *B. burgdorferi s.l.* devono essere testati.
4. I campioni emolizzati, lipemici, bilirubinemici o torbidi possono generare falsi risultati del test. È necessario raccogliere un campione fresco per eseguire nuovamente il test.
5. Sebbene non sia necessaria una formazione specifica, per ottenere prestazioni ottimali è necessario attenersi scrupolosamente alla procedura di test descritta nel foglietto illustrativo. La mancata osservanza della procedura può dare luogo a risultati inusuali.
6. Il siero di pazienti affetti da malattie diverse dalla malattia di Lyme, tra le quali sifilide, malattie parodontali, artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico e altre malattie autoimmuni o infettive, può produrre risultati falsi positivi.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI:

La prestazione del kit C6 Lyme ELISA™ è stata confrontata con quella del protocollo Two-Tier raccomandato dal CDC¹² (i campioni con risultati del test ELISA positivi o equivoci sono stati sottoposti a nuovo test mediante metodo Western Blot per la ricerca degli anticorpi IgG e IgM per determinare il risultato finale) in relazione alla specificità e alla sensibilità del test.

SPECIFICITÀ:

I campioni di siero sono stati ottenuti da 1842 donatori di sangue sani, che comprendevano 1329 campioni di siero ottenuti da individui provenienti da regioni endemiche per la malattia di Lyme (Nord-Est degli Stati Uniti) e 513 campioni di siero ottenuti da individui residenti in aree considerate non endemiche per la malattia di Lyme (Sud-Ovest degli Stati Uniti). I campioni di siero sono stati testati utilizzando il kit C6 Lyme ELISA™ e con il protocollo Two-Tier utilizzando un test ELISA con preparato cellulare intero sonicato nel primo passaggio (Tabella 1). La specificità del kit C6 Lyme ELISA™ è risultata statisticamente equivalente a quella del protocollo Two-Tier per i donatori di sangue sani provenienti da regioni endemiche e non endemiche ($p>0,05$).

Vedere l'Appendice: Tabella 1. Reattività nei donatori di sangue provenienti da regioni endemiche e non endemiche

SENSIBILITÀ:

Sono stati raccolti 517 campioni di siero ben caratterizzati da pazienti del Nord America a cui è stata diagnosticata la malattia di Lyme sulla base della presenza di (1) Eritema Migrante documentato; (2) positività alla PCR o in cultura a *B. burgdorferi*; o (3) artrite di Lyme o altri sintomi della malattia di Lyme disseminata. Risultati sierologici positivi non sono stati considerati un criterio di inclusione in questo gruppo.

Il test C6 Lyme ELISA™ è stato valutato confrontandolo con il protocollo Two-Tier nel gruppo di pazienti affetti da malattia di Lyme. In totale, il kit Lyme ELISA™ ha rilevato il 74,9% dei pazienti affetti da malattia di Lyme, rispetto al 55,3% rilevato dal protocollo Two-Tier (Tabelle 2 e 3). La Tabella 3 mostra il livello di sensibilità del test C6 Lyme ELISA™ rispetto al protocollo Two-Tier per l'individuazione di pazienti affetti da malattia di Lyme con coltura positiva.

Vedere l'Appendice: Tabella 2. Confronto tra test C6 Lyme ELISA™ e protocollo Two-Tier

Vedere l'Appendice: Tabella 3. Sensibilità per criteri di definizione del campione

La sensibilità del kit C6 Lyme ELISA™ per la determinazione degli anticorpi per *B. burgdorfer* nel siero di pazienti affetti da malattia di Lyme è stata anche valutata in relazione alla categoria dei sintomi. Il confronto dei livelli di sensibilità tra il test C6 Lyme ELISA™ e il protocollo Two-Tier è illustrato nella Tabella 4.

Vedere l'Appendice: Tabella 4. Sensibilità per categoria di sintomi

I campioni dei pazienti affetti dalla malattia di Lyme stratificati per tempo a partire dall'insorgenza della malattia sono stati sottoposti a test con il kit C6 Lyme ELISA™ e il protocollo Two-Tier come illustrato nella Tabella 5.

Vedere l'Appendice: Tabella 5. Sensibilità secondo il tempo trascorso dall'insorgenza della malattia

Un'analisi della reattività nel sottogruppo di pazienti con malattia di Lyme positivi al test Western Blot per la ricerca degli anticorpi IgG e IgM ha evidenziato che il 100% dei pazienti con risultati positivi al test Western Blot per gli IgG (n=157) e il 95,8% dei pazienti risultati positivi al test

Western Blot per gli IgM (n=192) risultavano anche positivi al test C6 Lyme ELISA™ (Tabella 6). Al contrario, il 47,5% dei pazienti positivi al test C6 Lyme ELISA™ (n=387) risultava positivo al test Western Blot per gli IgM e il 40,7% (n=386) risultava positivo al test Western Blot per gli IgG.

Vedere l'Appendice: Tabella 6. Risultati del test C6 Lyme ELISA™ e del test Western Blot

RISULTATI DELLO STUDIO PROSPETTICO:

È stato condotto uno studio prospettico su 1276 campioni di siero ricevuti in serie in due laboratori di riferimento per i test di screening della malattia di Lyme. I campioni di siero sono stati analizzati mediante il test C6 Lyme ELISA™ e il protocollo Two-Tier (Tabella 7). Sono stati evidenziati risultati concordanti nel 98,5% dei campioni analizzati.

Vedere l'Appendice: Tabella 7. Campioni prospettici: Risultati del test C6 Lyme ELISA™ e del protocollo Two-Tier

CONDIZIONI DI REATTIVITÀ CROCIATA:

Campioni di siero ottenuti da 366 individui affetti da patologie diverse dalla malattia di Lyme sono stati analizzati per la reattività crociata mediante il test C6 Lyme ELISA™. La Tabella 8 evidenzia i risultati per diciassette patologie. Due campioni di siero sono risultati positivi al test C6 ELISA e al protocollo Two-Tier, mentre un altro campione di siero è risultato positivo soltanto al protocollo Two-Tier (Tabella 9). Il test C6 Lyme ELISA™ ha dimostrato una specificità complessiva pari al 99,5% in tutte le categorie.

Vedere l'Appendice: Tabella 8. Condizioni di reattività crociata: Risultati del test C6 Lyme ELISA™

Vedere l'Appendice: Tabella 9. Condizioni di reattività crociata: Test C6 Lyme ELISA™ e protocollo Two-Tier

RIPRODUCIBILITÀ:

La riproducibilità è stata analizzata su un pannello di 8 campioni inclusi i controlli positivi e negativi e 6 campioni che rappresentavano 2 campioni di siero negativi, 2 campioni di siero con reazione debole e 2 campioni di siero positivi. La riproducibilità è stata valutata in quattro tipi di analisi: intra-test, inter-test, inter-lotto e inter-sito. I risultati ottenuti da ciascuna di queste analisi sono sintetizzati nella tabella seguente.

Vedere l'Appendice: Tabella 10. Riproducibilità: Risultati del test C6 Lyme ELISA™

INFORMAZIONI DI CONTATTO DI IMMUNETICS, INC.:

Immunitics, Inc.
27 Drydock Ave, 6TH Floor
Boston, MA 02210-2377 USA
Tel.: 800-227-4765 or 617-896-9100
Fax: 617-896-9110
Email: info@immunitics.com

Contattare Immunitics, Inc. per le traduzioni in altre lingue disponibili.

RAPPRESENTANTE AUTORIZZATO PER L'EUROPA:

Obelis s.a
Boulevard, General Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: (32) 2.732.59.54
Fax: (32) 2.732.60.03
Email: mail@obelis.net



Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit - Appendix

TABLES:

Table 1. Reactivity in Endemic and Non-Endemic Blood Donors

| | ENDEMIC | NON-ENDEMIC | TOTAL |
|--------------------------------|---------|-------------|-------|
| Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit | 98.6% | 99.2% | 98.8% |
| Two-tier ELISA/WB Kits | 99.3% | 99.8% | 99.5% |
| n= | 1329 | 513 | 1842 |

Table 2. C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier protocol

| | | TWO-TIER ELISA/WB | |
|----------------|-----|-------------------|--------------|
| n=517 | | POS | NEG |
| C6 Lyme ELISA™ | POS | 54% 279 | 20.9% 108 |
| | NEG | 1.3% 7 | 23.8% 123 |

Table 3. Sensitivity by Sample Definition Criteria

| | ALL LYME DISEASE PATIENTS | CULTURE-POSITIVE PATIENTS |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit | 74.9% | 64.9% |
| Two-tier ELISA + WB Kits | 55.3% | 41.0% |
| n= | 517 | 239 |

Table 4. Sensitivity by Symptom Category

| | ERYTHEMA MIGRANS | ARTHRITIS | BELL'S PALSYP | ALL NEUROLOGICAL |
|--------------------------------|------------------|-----------|---------------|------------------|
| Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit | 67.5% | 97.0% | 87.5% | 82.8% |
| Two-tier ELISA + WB Kits | 45.3% | 87.9% | 81.3% | 72.4% |
| n= | 369 | 99 | 16 | 29 |

Table 5. Sensitivity by Time after Onset

| | 1-7 Days | 8-14 Days | 15-21 Days | 22-30 Days | > 30 Days |
|--------------------------------|----------|-----------|------------|------------|-----------|
| Immunitics® C6 Lyme ELISA™ Kit | 52.5% | 75.0% | 82.8% | 100.0% | 79.2% |
| Two-tier ELISA + WB Kits | 28.7% | 50.0% | 44.8% | 75.0% | 71.7% |
| n= | 122 | 52 | 29 | 12 | 53 |

Table 6. C6 Lyme ELISA™ vs. Western Blot Results

| | | IgG WESTERN BLOT | |
|----------------|-------|------------------|--------------|
| | n=481 | POS | NEG |
| C6 Lyme ELISA™ | POS | 32.6% 157 | 47.6% 229 |
| | NEG | 0.0% 0 | 19.8% 95 |

| | | IgM WESTERN BLOT | |
|----------------|-------|------------------|--------------|
| | n=482 | POS | NEG |
| C6 Lyme ELISA™ | POS | 38.2% 184 | 42.1% 203 |
| | NEG | 1.7% 8 | 18.0% 87 |

Table 7. Prospective Samples: C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier Results

| | | TWO-TIER ELISA/WB | |
|----------------|--------|-------------------|---------------|
| | n=1276 | POS | NEG |
| C6 Lyme ELISA™ | POS | 2.8% 36 | 1.3% 17 |
| | NEG | 0.2% 2 | 95.7% 1221 |

Table 8. Cross-Reactive Conditions: C6 Lyme ELISA™ Results

| DISEASE CONDITION | n | POS | NEG |
|----------------------|-----|-----|-----|
| <i>H. pylori</i> | 20 | 0 | 20 |
| <i>M. pneumoniae</i> | 38 | 0 | 38 |
| CMV | 20 | 0 | 20 |
| EBV | 20 | 0 | 20 |
| HIV | 20 | 0 | 20 |
| Hepatitis A | 25 | 0 | 25 |
| Hepatitis B | 23 | 0 | 23 |
| Hepatitis C | 15 | 0 | 15 |
| Flu Vaccinee | 25 | 0 | 25 |
| ANA | 20 | 0 | 20 |
| RPR | 20 | 1 | 19 |
| Lipemic | 20 | 0 | 20 |
| Icteric | 20 | 0 | 20 |
| Hemolyzed | 20 | 1 | 19 |
| SLE | 20 | 0 | 20 |
| RA | 20 | 0 | 20 |
| RF | 20 | 0 | 20 |
| Total | 366 | 2 | 364 |

Table 9. Cross-Reactive Conditions: C6 Lyme ELISA™ vs. Two-Tier protocol

| | | TWO-TIER ELISA/WB | |
|----------------|-----|-------------------|-------|
| n=366 | | POS | NEG |
| C6 Lyme ELISA™ | POS | 0.5% | 0.0% |
| | | 2 | 0 |
| NEG | NEG | 0.3% | 99.2% |
| | | 1 | 363 |

Total Cross-Reactive Conditions

C6: 99.5% negative
 Two-tier: 99.2% negative

Table 10. Reproducibility: C6 Lyme ELISA™ Results

| SPECIMEN: | Intra-Assay | | Inter-Assay | Inter-Lot | Inter-Site |
|------------------|-------------|-------|-------------|-----------|------------|
| | AVG LI | CV% | CV% | CV% | CV% |
| Positive Control | 4.74 | 8.88 | 11.57 | 11.37 | 21.64 |
| Negative Control | 0.16 | 6.59 | 6.89 | 16.92 | 38.73 |
| 1 | 3.36 | 10.89 | 16.85 | 14.05 | 21.3 |
| 2 | 1.90 | 8.57 | 6.02 | 19.33 | 20.6 |
| 3 | 4.60 | 7.66 | 7.79 | 14.97 | 14.94 |
| 4 | 1.31 | 16.06 | 14.69 | 15.49 | 24.88 |
| 5 | 0.16 | 10.3 | 9.77 | 28.14 | 32.25 |
| 6 | 0.03 | 11.72 | 18.8 | 52.58 | 51.53 |

REFERENCES:

1. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, et al. 1982. Lyme disease- a tick borne spirochetosis? Science. 216:1317-19.
2. Steere AC. 1989. Lyme Disease. N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. Steere AC, Malawista SE. 1979. Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. Ann. Intern. Med. 91:730-3.
4. Levine JF, Wilson ML, Spielman A. 1985. Mice as reservoirs of the Lyme disease spirochete. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:355-60.
5. Burgdorfer W, Lane RS, Barbour AG, Gresbrink RA, Anderson JR. 1985. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34:925-30.
6. Barbour AG, Hayes SF. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
7. Dattwyler RJ. 1990. Lyme borreliosis: an overview of clinical manifestations. Lab. Med. 21:290-292.
8. Dattwyler, RJ. 1989. Immunodiagnosis of Lyme borreliosis. Rheum. Dis. Clin. N. Am. 15:727-34.
9. Szczepanski A, Benach J. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. Microbiol. Rev. 55: 21-34.
10. Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. 1984. Antibody response in Lyme disease; evaluation of diagnostic tests. J. Inf. Dis. 149: 789-95.
11. Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, Steere AC. 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness. J. Clin. Invest. 72: 504-515.
12. CDC (1995). Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. Mort. Morbid. Weekly Rep. 44: 590-1.
13. Liang, F.T., Alvarez, A., Gu, Y., Nowling, J.M., Ramamoorthy, R., Philipp, M.T. 1999. An Immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. J. Immunol. 163: 5566-5573.
14. Liang, F.T., Steere, A.C., Marques, A.R., Johnson, B.J.B., Miller, J.N., Philipp, M.T. 1999. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J. Clin. Microbiol. 37(12): 3990-3996.
15. Liang, F.T. and Philipp, M.T. 1999. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 67(12): 6702-6706.
16. Liang, F.T., Aberer, E., Cinco, M., Gern, L., Hu, C.M., Lobet, Y.N., Ruscio, M., Voet, P.E., Jr., Weynants, V.E., Philipp, M.T. 2000. Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *Borrelia burgdorferi* SI. J. Infectious Diseases 182.
17. Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Tilton RC. 2004. Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11(5):924-9.
18. Philipp MT, Wormser GP, Marques AR, Bittker S, Martin DS, Nowakowski J, Dally LG. 2005. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12(9):1069-74.
19. Philipp MT, Marques AR, Fawcett PT, Dally LG, Martin DS. C6 test as an indicator of therapy outcome for patients with localized or disseminated lyme borreliosis. 2003. J Clin Microbiol. 41(11):4955-60.
20. Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD Jr, Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ. 2003. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. J Infect Dis. 187(8):1187-99.