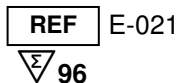


Produkt- und Gebrauchsinformation

Serazym® Anti-Borrelia-IgG



In-vitro-Diagnostikum

Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG-
Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*

REF	Bestell- Nr.	LOT	Chargen- Nr.
	Lagertemperatur		Hersteller
	Hinweise beachten		Verfallsdatum
	Arbeitsanleitung beachten		Anzahl Bestimmungen
			Biologische Gefahr

Einführung

Die Lyme-Borreliose ist eine systemische Infektionskrankheit mit vielfältigen klinischen Symptomen. Sie verläuft stadienhaft unter Beteiligung mehrerer Organsysteme. Leitsymptome des 1. Stadiums (4-8 Wochen) sind das Erythema chronicum migrans und lokale oder generalisierte Lymphadenopathien (Lymphadenosis cutis benigna). Die klinischen Erscheinungen des 2. Stadiums (1-12 Monate) äußern sich als Meningitis, Meningoradikulitis, Enzephalitis bis zu Hemiparesen, Muskel- und Gelenkschmerzen, insbesondere Kniegelenksarthritiden. Seltener sind Manifestationen am Herzen als lebensbedrohliche Myokarditis/ Pankarditis. Das 3. Stadium (Monate bis Jahre) ist durch chronischen Befall des Nervensystems (Neuroborreliose, progressive Enzephalomyelitis), der Haut (Acrodermatitis chronica atrophicans) und der Gelenke gekennzeichnet (chronische erosive Arthritis). Besonders die Spätmanifestationen der Borreliose können die Lebensqualität stark beeinträchtigen und sind antibiotisch schwer zu therapieren. Eine frühzeitige Diagnostik von Borrelieninfektionen ist deshalb von großer Bedeutung.

Erreger der Lyme-Borreliose ist eine 1982 von BURGDORFER et al. aus Zecken isolierte Spirochäte, die der Familie der Borrelien zugeordnet wurde. Hauptvektor von *Borrelia burgdorferi* in Europa ist der Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus*. Entsprechend dem Auftreten der Zecken in waldbereichen ländlichen Gebieten finden sich in diesen Regionen die häufigsten Erkrankungen mit einem Gipfel im Sommer und Herbst. Die Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Menschen geschieht durch Darminhalt/Fäkaltröpfchen der Zecken während des Saugaktes. Für Borrelieninfektionen besonders gefährdet sind in Forstwirtschaft und Gartenbau beschäftigte Personen, Jäger, Anwohner von Waldrändern, Camper in Waldgebieten sowie Soldaten bei militärischen Übungen im Gelände.

Regional unterschiedlich wird mit einer Borreliose Inzidenz von 2-40/100.000 Einwohner (Mitteldeutschland) bis 300/100.000 Einwohner (Österreich) gerechnet. Die Dunkelziffer ist vermutlich hoch, da ein Zeckenstich nicht immer bemerkt wird oder Erinnerungswertig ist und sich das typische Erythema chronicum migrans nur in etwa 50 % der Infektionen entwickelt.

Der sicherste Nachweis einer Borrelien-Infektion ist die kulturelle Anzucht der Erreger aus Blut, Liquor oder Hautbiopsien. Diese wird jedoch limitiert durch lange Vermehrungszeiten der Borrelien, die komplexe Zusammensetzung der Nährmedien und die relativ geringe Nachweisempfindlichkeit. Als Routineverfahren ist die Kultur daher ebenso wenig geeignet wie der immunhistologische Erregernachweis in Gewebeschnitten. Methoden der Wahl sind deshalb der Nachweis von IgG- und/oder IgM-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz (IFT) oder Enzymimmunoassay (ELISA). Im ELISA werden Borrelien-Sonikate, Extrakte oder partiell gereinigte Antigene zur Beschichtung von Mikrotitrationsplatten eingesetzt. Wegen des regional unterschiedlichen Vorkommens von Subtypen (Genospezies) und der bekannten Variabilität der Oberflächenproteine von *Borrelia burgdorferi* werden häufig Antigenmische bevorzugt. Als Bestätigungstest sind Blot-Methoden (Western blot, Dot blot, Line Assay) unerlässlich. Das Ergebnis der serologischen Tests ist stets im klinischen Kontext zu interpretieren. Negative Resultate schließen eine Borreliose (Frühstadium, seronegative Fälle) nicht aus.

Literatur:

- Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B. Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Ssensu Lato J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1433-1444
- Wilske, B.; Zöller, L.; Brade, V.; Eiffert, H.; Göbel, U.B.; Stanek, G.; Pfister, H.-W. Lyme-Borreliose MIQ Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik; 12 URBAN & FISCHER München Jena 2000 ISBN 3-437-41582-4
- Kamradt, T., Krause, A., Priem, S., Burmester, G. R. Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie Dt. Ärzteblatt 1998, 95: 214-219
- Porstmann, T. Labordiagnostik der Borrelieninfektion in: Talaska, T. (Hrsg.): Symposium Lyme Borreliose: 35-38 DPC Akademie Bad Nauheim 1998

5. Talaska, T.
Diagnostische Methoden bei Borrelien-Infektionen - Übersicht -
in: Talaska, T. (Hrsg.): Für die Praxis: Lyme-Borreliose
ISBN 3-00-002363-1
6. Tewald, F., und Braun, R.
Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei
Verdacht auf Borrelieninfektion
Clin. Lab. 1998, 44: 897-902
7. Wilske, B., Fingerle, V., Hauser, U. und Rössler, D.
Borrelien
Diagnostische Bibliothek 48: 1-12
Blackwell Wissenschafts-Verlag, Juni 1997
8. Lawrenz, M. B., Hardham, J. M., Owens, R.T., Nowakowsky, J.,
Steere, A. C., Wormser, G.P., Norris, S. J.
Human Antibody Responses to VlsE Antigenic Variation Protein
of *Borrelia burgdorferi*
J. Clin. Microbiol. 1999, 37/12: 3997-4004
9. Liang, T. F., Steere, A. C., Marques A. R., Johnson, B. J. B.,
Miller J. N., Philipp M. T.
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. 1999, 37/12: 3990-3996
10. Peltomaa, M., McHugh, G., Steere, A. C.
The VlsE (IR₅) Peptide ELISA in the Serodiagnosis of Lyme
Facial Paralysis
Otolaryngology & Neurology 2004, 25: 838-841
11. Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl
C., Johnson B. J. B., Wilske, B.
Significant Improvement of the Recombinant *Borrelia*-Specific
Immunoglobulin G Immunoblot Test by Addition of VlsE and a
DbpA Homologue Derived from *Borrelia garinii* for Diagnosis of
Early Neuroborreliosis
J. Clin. Microbiol. 2003, 41/3: 1299-1303

Anwendungsbereich

Der *Serazym*[®] Anti-*Borrelia*-IgG ist ein in-vitro-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in humanen Serum- oder Plasmaproben

Testprinzip

Der *Serazym*[®] Anti-*Borrelia*-IgG ist ein Festphase Sandwich ELISA auf der Basis eines an die feste Phase adsorbierten Gemisches gereinigter Antigene eines *Borrelia afzelii* Stammes **unter Zusatz des hochspezifischen VlsE-Antigens**. Proben und Kalibratoren werden in die mit Antigenen beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen dosiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C werden die ungebundenen Komponenten aus den Vertiefungen abgesaugt und die Vertiefungen 3X mit Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von anti-Human-IgG-F(ab)₂-POD-Konjugat wird für weitere 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 3X gewaschen. Nachfolgend wird Substrat (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) in die Vertiefungen pipettiert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, wodurch sich blaue Produktlösungen gelb verfärben. Die Extinktion der gelben Lösungen wird durch Vertikalphotometrie bei 450 nm Wellenlänge (Referenzfilter ≥ 620 nm) bestimmt. Die Auswertung erfolgt unter Bezug auf die Extinktionen der mitgeführten Kalibratoren.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Humane Serum-, Plasma- oder Liquorproben können mit dem *Serazym*[®] Anti-*Borrelia*-IgG auf IgG-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* untersucht werden.

Die Serum- und Plasmaproben werden hierzu 1 : 101 extern verdünnt, z.B. 5 µl Probe + 500 µl Verdünnungsmedium.

Die Proben sollten steril entnommen und maximal 48 Stunden bei 2...8 °C gelagert werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiten sind die Proben bei -20 °C zu lagern. Gefrorene Proben auf Raumtemperatur erwärmen und gut mischen. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Testkomponenten für 96 Kavitäten

1 WELLS	Mikrotiterplatte mit 12 teilbaren Streifen zu je 8 Kavitäten (insg. 96) beschichtet mit gereinigten <i>Borrelia afzelii</i> Antigenen, supplementiert mit VlsE	1 vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
2 WASHBUF CONC 10X	Waschpuffer, 10-fach für 1000 ml Lösung	100 ml Konzentrat, weiße Kappe
3 DIL	Verdünnungsmedium	100 ml gebrauchsfertig, schwarze Kappe
4 CAL 1 - 4	Kalibratoren 1 bis 4 Anti- <i>Borrelia</i> -IgG-Antikörperhaltiges Serum K1 = 40 U/ml K2 = 100 U/ml K3 = 250 U/ml K4 = 1000 U/ml	je 1,0 ml gebrauchsfertig, weiße Kappe
5 CONTROL -	Negative Kontrolle Verdünntes Serum	1,0 ml gebrauchsfertig, grüne Kappe
6 CONTROL +	Positive Kontrolle Anti- <i>Borrelia</i> -IgG-Antikörperhaltiges Serum Deklaration: siehe Analysenzertifikat	1,0 ml gebrauchsfertig, rote Kappe
7 CONJ HRP	POD-Konjugat POD-markierte polyklonale Antikörper (Schaf)	15 ml gebrauchsfertig, rote Kappe
8 SUBSTR TMB	Substrat Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	15 ml gebrauchsfertig, blaue Kappe
9 STOP	Stopplösung 0,25 M Schwefelsäure	15 ml gebrauchsfertig, gelbe Kappe

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- verstellbare Mikropipetten
- verstellbare Mehrkanalpipette
- Glassgefäße
- Röhrchen (1ml) für die Probenverdünnung
- Pipettenspitzen
- Flüssigkeitsreservoir für 8-Kanalpipette
- Brutschrank (37 °C)
- automatischer Plattenwascher oder 8-Kanal Handwaschkamm mit Vakuumpumpe und Abfallbehältern
- automatisches Mikrotiterplatten-Photometer mit 450 und 620 nm oder 690 nm
- Filtern
- destilliertes Wasser

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck (1X96 Vertiefungen) erlaubt die quantitative Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in maximal 90 Proben als Einzelbestimmung. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Mikrotitrationsstreifen ist bei Lagerung bei 2...8 °C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Alle geöffneten Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung bei 2...8 °C mindestens 4 Wochen haltbar.

Vorbereitung und Verwendung

Die Mikrotiterplatte mit teilbaren Strips ist in einem aluminiumbeschichteten Beutel zusammen mit Trockenmittel vakuumversiegelt. Öffnen der Verpackung erst nach Erreichen der Raumtemperatur. Nicht gebrauchte Kavitäten vor Feuchtigkeit schützen und zusammen mit dem Trockenmittel in den Beutel zurücklegen und verschließen.

Waschpufferkonzentrat (10fach) 1 + 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

Beispiel:

10 ml Waschpufferkonzentrat (2) + 90 ml destilliertes Wasser. Die auf diese Weise verdünnte Waschlösung ist bei 2...8 °C mindestens 30 Tage haltbar.

Beim Waschvorgang dispensierte Waschlösung mindestens 5 Sekunden einwirken lassen und Waschlösungsreste durch gründliches Absaugen oder Ausschlagen der Kavitäten entfernen.

Substrat vor Licht geschützt aufbewahren.

Testdurchführung

- **Proben mit Verdünnungsmedium (3) 1 + 100 (v/v) verdünnen, z.B. 5 µl Serum + 500 µl Verdünnungsmedium (3)**

Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeitakt sind einzuhalten!

Bei größeren Probenserien empfiehlt sich das Pipettieren der Reagenzien aus Flüssigkeitsreservoirs mittels Mehrkanalpipette um Zeitverzögerungen zu vermeiden.

Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf RT erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. **100 µl CAL** (gebrauchsfertige Kalibratoren 1, 2, 3 und 4) **(4)**, **100 µl Control -** (Negative Kontrolle) **(5)**, **100 µl Control +** (Positive Kontrolle) **(6)** und je **100 µl** verdünnte Probe pipettieren.
3. Platte abkleben und **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
4. Absaugen und **3 mal** mit **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus **(2)**) waschen.
5. **100 µl CONJ HRP (7)** pipettieren
6. Platte abkleben und **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
7. Absaugen und **3 mal** mit **300 µl** Waschlösung (verdünnt aus **(2)**) waschen.
8. **100 µl SUBSTR TMB (8)** pipettieren.
9. **15 min** lichtgeschützt bei 37 °C inkubieren.
10. **100 µl STOP (9)** pipettieren und kurz schütteln.
11. Messen der OD bei **450 nm** gegen 620 oder 690 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer innerhalb von 30 Minuten.

Berechnung der Ergebnisse

Konstruieren Sie eine Bezugskurve durch Auftragen der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren (y-Achse) gegen die entsprechenden Antikörperkonzentrationen (x-Achse) der Kalibratoren. Die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren berücksichtigen bereits den regulären Verdünnungsfaktor der Serumproben von 101.

Wandeln Sie die Extinktionen der verdünnten Proben in Antikörperkonzentrationen U/ml (Units/ml) durch Ablesen an der Bezugskurve um. Bei Proben, deren Extinktion diejenige des Kalibrators K4 überschreitet, ist die Bestimmung mit einer höheren externen Vorverdünnung zu wiederholen und das Ergebnis mit dem Faktor der zusätzlichen Verdünnung zu multiplizieren.

Serumproben mit ermittelten Antikörperkonzentrationen > 61 U/ml sind als positiv beim Nachweis von anti-*Borrelia burgdorferi*-IgG Antikörpern, Proben mit Antikörperkonzentrationen < 50 U/ml als negativ zu bewerten. Proben mit ermittelten Antikörperkonzentrationen zwischen 50 und 61 U/ml (Grauzone) sollten erneut im ELISA bestimmt werden. Gegebenenfalls empfiehlt es sich eine weitere, im Abstand von 1-2 Wochen entnommene Serumprobe zu untersuchen.

Referenzwerte

Serazym® Anti-Borrelia-IgG	
Negativ	< 50 U/ml
Positiv	> 61 U/ml
Graubereich	50 - 61 U/ml

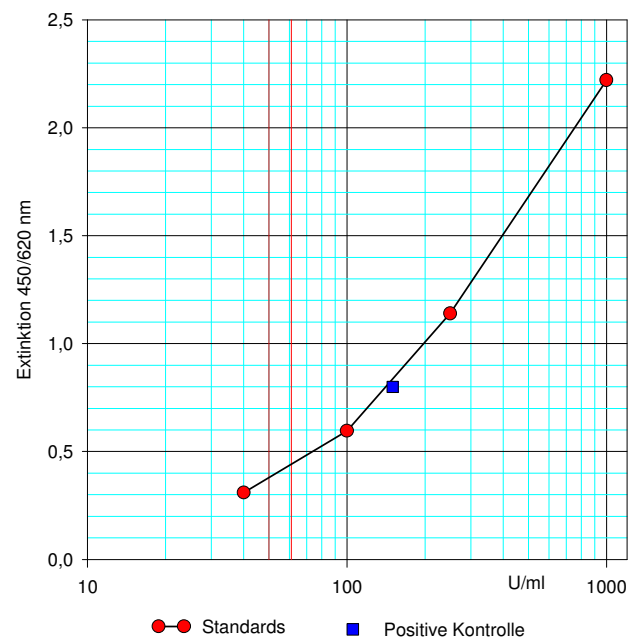
Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn

- Extinktion des Kalibrators K1 ≤ 0,50
- Extinktion des Kalibrators K4 ≥ 1,50

Sind die o. g. Gültigkeitskriterien nicht erfüllt, muss der Testansatz wiederholt werden. Stellen Sie sicher, dass die Abarbeitung strikt gemäß Testanleitung erfolgt (korrekte Reagenzienvorbereitung, korrekte Inkubationszeiten und -temperaturen, sorgfältiges Waschen). Sollten die Gültigkeitskriterien auch nach wiederholtem Testansatz nicht erfüllt sein, kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Typische Bezugskurve



Grenzen der Methode

Die Immunantwort bei der Borreliose folgt bestimmten Gesetzmäßigkeiten. Die frühe Antikörperbildung richtet sich zuerst gegen das Flagellenprotein. Das Flagellin von *Borrelia burgdorferi* zeigt zwar nur geringe Variationen innerhalb der Spezies, nachteilig sind aber Sequenzhomologien am C- und N-Terminus mit Flagellenproteinen anderer Spirochäten. Eine Infektion mit letzteren kann mit *Borrelia burgdorferi* kreuzreagierende Antikörper induzieren, die bei hohen Titern in bestimmten Fällen falsch reaktive ELISA-Ergebnisse verursachen können.

Eine Interpretation des Ergebnisses sollte nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein, um anhand des Titerverlaufes und der klinischen Symptomatik zwischen einer aktiven Borreliose und persistierenden Antikörpern nach längerer zurückliegender Infektion zu differenzieren.

Reaktive Serumproben beim Nachweis von *Borrelia burgdorferi*-IgG-Antikörpern im ELISA sollten durch Bestätigungstests (z.B. Westernblot) verifiziert werden.

Wie bei allen (enzym) immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze sowie Kreuzkontaminationen der Testbesteckreagenzien und Proben zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Inkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Inkubation der Proben und der Kontrollen können zu falschen Ergebnissen führen.

Leistungsmerkmale

Präzision

Intra-Assay-Variationskoeffizienten (VK):

Probe	Konzentration U/ml	VK (%)
1	842	8,1
2	424	5,7
3	156	7,3
4	104	6,5

Inter-Assay-Variationskoeffizienten (VK):

Probe	Konzentration U/ml	VK (%)
1	611	6,9
2	349	6,9
3	147	7,9
4	70	6,0

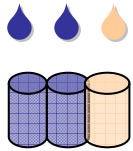
Spezifität und Sensitivität

Spezifität und Sensitivität des *Serazym*[®] Anti-Borreliose-IgG wurden mit Hilfe eines Kollektivs von mehr als 3000 klinisch unauffälligen Seren und 70 Serumproben mit klinischer Diagnose einer Borreliose erhoben.

Danach beträgt die Testsensitivität 95 % und die Testspezifität 98 %.

Inkubationsschema

Serazym® Anti-Borrelia-IgG (E-021)

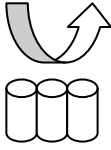


je 100 µl
100 µl

CAL1 bis 4 (4), Control - (5), Control + (6)
extern 1 : 101 verdünnte Serumproben

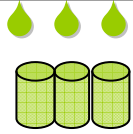
30 min

Inkubation (37 °C)



3 X Waschen

mit Waschlösung

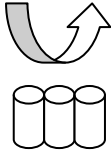


100 µl

CONJ HRP (7)

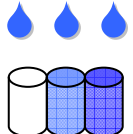
30 min

Inkubation (37 °C)



3 X Waschen

mit Waschlösung

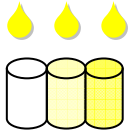


100 µl

SUBSTR TMB (8)

15 min

Inkubation (37 °C) lichtgeschützt



100 µl

STOP (9)

Messung der Extinktionen bei 450/ 620 nm – 690nm

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Dieses Testbesteck ist nur zum *in-vitro*-Gebrauch bestimmt und darf nur von geschultem Laborfachpersonal durchgeführt werden. Die Arbeitsanleitung ist strikt einzuhalten.

Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden.

Das Mischen von Testbesteckkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt. Ausnahme: Verdünnungsmedium, Waschpuffer, TMB/Substratlösung und Stopplösung.

Die Verwendung von Reagenzien anderer Hersteller zur Komplettierung eines geöffneten Testbestecks ist nicht erlaubt.

Einige Reagenzien enthalten geringe Mengen Kathon (1,0 % v/v) und Thimerosal (0,01 % w/v) als Konservierungsmittel. Reagenzien nicht verschlucken und Kontakt mit Schleimhäuten vermeiden.

Die Lagertemperatur der Reagenzien bis zur Wiederverwendung beträgt 2...8 °C.

Beim Umgang mit den Komponenten des Testbestecks sowie mit den Patientenproben und Kontrollen sind die Vorschriften zur Unfallverhütung beim Umgang mit potentiell infektiösem Material und gefährlichen Chemikalien zu beachten. Insbesondere sind folgende Regeln einzuhalten:

- Nicht essen, trinken oder rauchen!
- Nie mit dem Mund pipettieren!
- Handschuhe zur Vermeidung von Kontakt mit den Reagenzien und Proben tragen!
- Sicherheitshinweise zu den einzelnen Testkomponenten beachten!