













Seraline[®] Anti-Borrelia-8 IgG Seraline[®] Anti-Borrelia-8 IgM

Line Immunoassay zum Nachweis von IgG oder IgM Antikörpern gegen
Borrelia burgdorferi sensu lato in humanem Serum oder Plasma

 LIA-006-8 G  20  LIA-006-8 G-12  12x 20  *In-vitro*-Diagnostikum 
 LIA-006-8 M  20  LIA-006-8 M-12  12x 20  *In-vitro*-Diagnostikum 



Seramun Diagnostica GmbH · Spreehagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
Telefon +49 (0) 33767 79110 · Fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Einführung

Die Lyme-Borreliose ist eine systemische Infektionskrankheit mit vielfältigen klinischen Symptomen. Man unterscheidet drei Stadien der Erkrankung unter Beteiligung mehrerer Organsysteme. Leitsymptome des 1. Stadiums (4 - 8 Wochen) sind das Erythema chronicum migrans und eine lokale oder generalisierte Lymphadenopathie (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 (chronische erosive Arthritis) gekennzeichnet. Besonders die Spätmanifestationen der Borreliose können die Lebensqualität stark beeinträchtigen und sind antibiotisch schwer zu therapieren. Eine frühe Diagnostik von Borrelieninfektionen ist deshalb von großer Bedeutung. Erreger der Lyme-Borreliose ist eine 1982 von BURGDORFER aus Zecken isolierte Spirochäte, die der Gattung *Borrelia* zugeordnet wurde. Hauptvektor von *Borrelia burgdorferi* in Europa ist der Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus*. Entsprechend des Vorkommens der Zecken in waldreichen 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 (Mitteldeutschland) bis 300 / 100.000 Einwohner (Österreich) gerechnet.

Die Dunkelziffer ist vermutlich höher, da ein Zeckenstich nicht immer bemerkt wird oder Erinnerung ist und sich das typische Erythema chronicum migrans nur in etwa 50% der *Borrelia burgdorferi* Infektionen entwickelt. Der sicherste Nachweis einer Borrelien-Infektion ist zweifellos 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 bei Anzucht aus Patientenmaterial. Als Routineverfahren ist die Kultur daher ebenso wenig geeignet wie der immunhistologische Borreliennachweis in Gewebeschnitten. Die Methode der Wahl (MIQ 2000) für die erste Stufe der Diagnostik ist deshalb der Nachweis von IgG- und / oder IgM-Antikörpern mittels Enzymimmunoassay (ELISA). Im ELISA werden Borrelien-Sonikate, partiell gereinigte oder rekombinante Antigene zur Beschichtung der festen Phase eingesetzt. Wegen des regional unterschiedlichen Vorkommens von Subtypen (Genospezies) und der bekannten Variabilität der Oberflächenproteine von *Borrelia burgdorferi* werden häufig Antigengemische bevorzugt. Als Bestätigungstest (zweite Stufe) haben sich die Line Immunoassays mittlerweile fest etabliert. Die serologischen Ergebnisse müssen immer im Zusammenhang mit den klinischen Befunden interpretiert werden. Negative Serumbefunde schließen eine Lyme-Borreliose nicht aus, denn bei jedem Infektionsstadium gibt es seronegative Fälle.

Literatur:

1. Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B., Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1433-1444
2. 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
3. Kamradt, T., Krause, A., Priem, S., Burmester, G. R., Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie, Dt. Ärzteblatt 1998, 95: 214-219
4. 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 (IR₆) 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 *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM ist ein empfindlicher Line Immunoassay (LIA) zum Nachweis von borrelienspezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma. Er sollte als Bestätigungstest nach positiven ELISA-Suchtest eingesetzt werden.

Testprinzip

Die Antigene werden auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen und fixiert. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran wird diese in gebrauchsfertige Streifen geschnitten. Die Reaktion zum Nachweis der spezifischen Antikörper erfolgt in 3 Schritten:

Schritt 1

Die zu untersuchenden Proben werden in einer Verdünnung von 1 : 101 zusammen mit Teststreifen in den Vertiefungen der Inkubationswanne inkubiert. Dabei reagieren die spezifischen Antikörper mit den auf der Membran fixierten Antigenen. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden die nicht gebundenen Probenbestandteile durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit Wasch- und Inkubationspufferlösung (WIB) entfernt.

Schritt 2

Enzymmarkierte (Meerrettichperoxidase, POD) Konjugatantikörper (Isotypenspezifische) reagieren mit den an die Antigenbanden gebundenen Probenantikörpern. Nach 45 Minuten Inkubationszeit werden nicht gebundene Konjugatmoleküle durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit WIB entfernt.

Schritt 3

Während der Substratreaktion setzen die gebundenen POD-Moleküle des Konjugats das Substrat unter Ausbildung blauer Präzipitate um. Die Reaktion wird nach 10 min durch Absaugen und 3maliges Spülen der Teststreifen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser gestoppt.

Die gefärbten Antigenbanden auf den getrockneten Teststreifen werden durch Anlegen der Auswerteschablone identifiziert und das Testergebnis entsprechend der Auswertekriterien bestimmt. Die identifizierten Banden sind im Protokoll zu dokumentieren. Alternativ können die Teststreifen mit der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden.

Verwendete Borrelien Antigene

Bezeichnung*	Charakterisierung / Spezifität		Herkunft
p100	Protein der Membran-Vesikel auf der Oberfläche	hochspezifisch	<i>B. afzelii</i>
VlsE	Oberflächenlipoprotein variable major protein-like sequence expressed	spezifisch	<i>B. afzelii</i>
p58	nicht ausreichend charakterisiert	spezifisch	<i>B. garinii</i>
p41 (Flagellin)	Strukturprotein der Endoflagellen	unspezifisch	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>
p39 (BmpA)	Flagellinkomplex Borrelia membrane protein A	spezifisch	<i>B. afzelii</i>
p31 (OspA)	Oberflächenprotein A Outer surface protein A	spezifisch	<i>B. afzelii</i>
p23 (OspC)	Oberflächenprotein C Outer surface protein C, Gemisch von verschiedenen Genospezies	hochspezifisch	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. garinii II</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. spielmanii</i>
p18 (DbpA)	Oberflächenprotein Decorin binding protein A	spezifisch	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. spielmanii</i>

* Die Nomenklatur für eine Reihe von Banden wird in der Literatur hinsichtlich Molekulargewicht, Spezifität und Wertigkeit in den einzelnen Erkrankungsstadien nicht einheitlich wiedergegeben.

Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum- oder Plasmaproben (EDTA-, Citrat- oder Heparinplasma) können auf Präsenz von spezifischen Antikörpern untersucht werden. Die Proben werden 1 : 101 (15 µl Probe und 1500 µl WIB) mit der gebrauchsfertigen Wasch- und Inkubationslösung (hergestellt aus konzentriertem WIB (2)) in der Inkubationswanne verdünnt. 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. Tiefgefrorene Proben müssen vor dem Testen auf Raumtemperatur erwärmt und gut gemischt werden. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Die Verwendung von kontaminierten Proben kann die Hintergrundfärbung der Streifen erhöhen und darüber hinaus zu falschen Ergebnissen führen.

Testkomponenten

			Für 20 Bestimmungen	Für 12 x 20 Bestimmungen
1	TESTSTR	Teststreifen inkl. Auswerteschablone	20 Streifen Farbcodierung: dunkelblau	12 x 20 Streifen Farbcodierung: dunkelblau
2	WIB CONC 5x	Wasch- und Inkubationspuffer, 5-fach	70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe	12 x 70 ml Konzentrat, transparente Flasche, schwarze Kappe
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgM	Anti-human IgG-POD-Konjugat oder Anti-human IgM-POD-Konjugat	35 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe IgM , grün gefärbt, transparente Flasche, grüne Kappe	12 x 35 ml gebrauchsfertig, IgG , rot gefärbt, transparente Flasche, rote Kappe IgM , grün gefärbt, transparente Flasche, grüne Kappe
4	SUBSTR TMB	Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe	12 x 35 ml gebrauchsfertig, schwarze Flasche, blaue Kappe
5	INCUTRAY	Inkubationswanne mit Deckel	2	-

Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- Messzylinder und Bechergläser
- Pipetten und Pipettenspitzen für 15 µl und 1500 µl
- Kunststoffpinzette
- Wipp-Schüttler
- Filterpapier
- Absaugsystem mit Auffanggefäß für infektiöse Lösungen
- destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Inkubationswannen (√ 12 x 20)

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Testbesteckformat und Haltbarkeit

Mit einem Testbesteck können 20 oder 12 x 20 Bestimmungen durchgeführt werden. Das komplette Testbesteck mit verschlossenen Reagenzflaschen und Teststreifen ist bei Lagerung bei 2...8°C bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die Testbesteckbestandteile sind bei ordnungsgemäßer Lagerung nach Öffnung innerhalb von 3 Monaten zu verbrauchen.

Vorbereitung und Verwendung

Vor Testansatz sind alle Reagenzien auf Raumtemperatur zu erwärmen. Stellen Sie die gebrauchsfertige Wasch- und Inkubationslösung her, indem Sie das Wasch- und Inkubationspufferkonzentrat (5-fach) vor Verwendung gründlich schütteln und 1 : 5 mit destilliertem Wasser verdünnen.
Beispiel: 20 ml WIB (5-fach) + 80 ml destilliertes Wasser

Testdurchführung

- Der Test ist bei Raumtemperatur (18...25°C) durchzuführen.
- Teststreifen mit einer Kunststoffpinzette so in die Inkubationswanne legen, dass die aufgedruckten Nummern nach oben zeigen.
- Alle Inkubationsschritte sollten auf einem Wipp-Schüttler mit einer empfohlenen Schüttelfrequenz von ca. 20 bis 30 Rotationen pro Minute erfolgen.
- Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten.

Arbeitsschritte

1. Teststreifen mit **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) **5 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
2. **15 µl** Probe zugeben.
3. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
4. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
5. **1,5 ml** **CONJ HRP** zugeben.
6. Wanne mit Deckel abdecken und **45 min** auf Wipp-Schüttler inkubieren.
7. Lösungen absaugen und Teststreifen **3 x 5 min** mit jeweils **1,5 ml** Wasch- und Inkubationspufferlösung (gebrauchsfertig, hergestellt aus (2)) waschen.
8. Teststreifen mit **1,5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** auf Wipp- Schüttler inkubieren.
9. Substrat absaugen und Teststreifen zum Abstoppen der Farbreaktion **3 x** mit **1,5 ml** destilliertem Wasser spülen.
10. Die Teststreifen sind nach dem Abstoppen zwischen Filterpapier zu trocknen und anschließend auszuwerten.

Achtung:

Bei „Problemseren“ (Hypergammaglobulinämien, zirk. Immunkomplexe, Milchantikörper) kann sich der Hintergrund der Streifen sehr schnell blau färben. In solchen Fällen ist die Farbreaktion vorzeitig durch dreimaliges Spülen mit destilliertem oder deionisiertem Wasser zu stoppen.

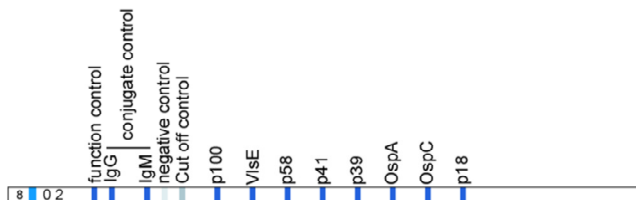
Auswertung

Gültigkeitskriterien für den Test

Auf jedem Teststreifen des *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM sind untereinander 5 Kontrollbänder aufgetragen:

- Die Funktionskontrolle (positive Bande mit jeder Probe).
- Die Konjugatkontrollen IgG und IgM (positive Bande nur mit dem eingesetzten Konjugat IgG oder IgM).
Achtung: Die jeweils andere Konjugatkontrolle kann in Abhängigkeit von der Probe auch eine blassere, unspezifische Bande zeigen.
- Die Negativ-Kontrolle (Bandenintensität muss kleiner sein, als die der Cut-off-Kontrolle).
- Die Cut-off-Kontrolle (Bandenintensität dient der Bewertung der diagnostischen Bänder als positiv oder negativ).

Der Test kann ausgewertet werden, wenn die Funktionskontrolle, die erwartete Konjugatkontrolle und die Cut-off-Kontrolle sichtbar sind.



Interpretation der Ergebnisse

Die Testauswertung sollte nur an trockenen Streifen erfolgen. Die Teststreifen können mit Hilfe der Evaluierungssoftware *Seraline*[®]scan automatisch ausgewertet werden. Alternativ kann die Zuordnung der Bänder mit Hilfe der beiliegenden Auswerteschablone durchgeführt werden. Die identifizierten Bänder sind im Protokoll zu dokumentieren.

Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

Bewertung	IgG	IgM
negativ	max. 1 Bande außer VlsE > Cut-off-Kontrolle	keine Bande außer p41 > Cut-off-Kontrolle
grenzwertig	VlsE oder 1 Bande + p41 ≥ Cut-off-Kontrolle	1 Bande außer OspC oder p41 oder p18 ≥ Cut-off-Kontrolle
positiv	2 Bänder außer p41 ≥ Cut-off-Kontrolle	OspC oder p18 oder 2 andere Bänder ≥ Cut-off-Kontrolle

Inverse Antigenbänder (helle Antigenbänder auf dunklem Hintergrund) sind als negativ zu bewerten. Die entsprechende Probe sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass es zwischen *Borrelia* und anderen Spirochäten zu Kreuzreaktionen kommen kann. Bei den folgenden Infektionskrankheiten können kreuzreagierende Antikörper auftreten: Syphilis (*Treponema pallidum*), Frambösie (*Treponema pertenue*), Leptospirosen (*Leptospira* spez.), Rückfallfieber (*Borrelia* spez.).

Aufgrund von polyklonalen B-Zellstimulationen, ausgelöst durch eine Infektion mit EBV, kann es in seltenen Fällen zu unspezifischen Reaktionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato spezifischen Antigenen kommen.

Leistungsmerkmale

Sensitivität

Panel 1:

Seren von Patienten mit Verdacht auf Borreliose (n = 78) wurden vergleichend im *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM und einem anderen kommerziellen Line Immunoassay untersucht.

n = 78		Vergleichs – Line Immunoassay	
		positiv	negativ
<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8	positiv	51	10
	negativ	1	16

Unter Bezugnahme auf die mit dem Vergleichstest erhaltenen Ergebnisse wurde eine Sensitivität von 98,1% ermittelt. Alle n = 11 diskrepant bestimmten Seren wurden zusätzlich im *Serablot*[®] Anti-Borrelia-IgG/IgM sowie in einem weiteren Westernblot untersucht. Dabei konnten 8 der 10 positiven *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 Ergebnisse durch die Blot-Ergebnisse bestätigt werden. Die im *Seraline*[®] Test negativ und im Vergleichstest positiv bestimmte Probe reagierte im *Serablot*[®] schwach positiv.

Panel 2:

Seren von Patienten mit Verdacht auf frische Borrelieninfektion (n = 32) wurden im *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM und einem anderen kommerziellen Line Immunoassay auf borrelienspezifische IgM Antikörper untersucht.

n = 32		Vergleichs – Line Immunoassay IgM	
		positiv	negativ
<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8 IgM	positiv	9	8
	negativ	0	15

Unter Bezugnahme auf die mit dem Vergleichstest erhaltenen Ergebnisse wurde eine Sensitivität von 100% ermittelt. Alle n = 8 diskrepant bestimmten Seren wurden zusätzlich im *Serablot*[®] Anti-Borrelia IgM untersucht. Dabei konnten 6 der 8 im *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM positiv bestimmten Seren im Blot bestätigt werden.

Spezifität

Ein Kollektiv von 400 Blutspenderseren wurde zur Ermittlung der Spezifität im *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM untersucht. Von diesen Proben wurden 47 (39 positiv und 8 grenzwertig) im IgG-Nachweis und 22 (17 positiv und 5 grenzwertig) im IgM-Nachweis positiv bestimmt.

Spezifität IgG: 88,2% Spezifität IgM: 94,5%

Grenzen der Methode

Eine Interpretation des Ergebnisses soll nur in enger Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen. Im Einzelfall können Wiederholungsuntersuchungen in mehrwöchigem Abstand hilfreich sein. Wie bei allen immunologischen Bestimmungsmethoden können Verunreinigungen der Reagenzien, aber auch der Proben durch Bakterien oder Pilze zu inkorrekten Ergebnissen führen.

Nichtkorrektes Waschen zur Abtrennung ungebundener Bestandteile aus Probe und Testreagenz sowie ein inkorrektes Zeitregime bei der Durchführung des Tests können ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen.

Interferenz

Hämolytische, lipämische und ikterische Proben bis zu einer Konzentration von 500 mg/dl (Hämoglobin), 1000 mg/dl (Lipide) und 20 mg/dl (Billirubin C und Billirubin F) führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse. Rheumafaktoren bis zu einer Konzentration von 500 IU/ml beeinflussen ebenfalls nicht die Ergebnisse.

Kreuzreaktivität

Ein Kollektiv von insgesamt 195 potenziell kreuzreaktiven Serumproben wurde im *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM untersucht.

Die Ergebnisse der Gesamtbewertungen IgG + IgM Nachweise sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

n=195	<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8		
	positiv	grenzwertig	negativ
ANA (n=51)	7	3	41
EBV (n=30)	3	0	27
CMV (n=67)	13	2	52
Syphilis (n=47)	4	1	42

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. Teststreifen und Reagenzien aus beschädigten Verpackungen bzw. Flaschen dürfen nicht verwendet werden. Die Teststreifen dürfen nur mit einer Kunststoffpinzette gehandhabt werden. Vor Testbeginn sollten im Protokollvordruck Probenidentifikationsnummer, Teststreifennummer und Chargennummer notiert werden. Das Testbesteck oder seine geöffneten Reagenzien sind nur innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsfristen zu verwenden. **Das Mischen von Testkomponenten verschiedener Chargen ist nicht erlaubt mit Ausnahme von Wasch- und Inkubationspuffer und Substrat.** Die Komplettierung eines geöffneten Testbestecks mit Reagenzien anderer Hersteller ist nicht erlaubt. Einige Reagenzien können Biozide als Konservierungsmittel enthalten. Nähere Angaben sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen. 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 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!**



Änderungshistorie

Version	Abschnitt	Änderungen
2018-03-15	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	Aktualisierung



Hersteller



Bestell-Nummer



Chargen-Nummer



Anzahl der Bestimmungen



Biologische Gefahr



Hinweise beachten



Verfallsdatum















Lagertemperatur



Arbeitsanleitung beachten

Seraline[®] Anti-Borrelia-8 IgG Seraline[®] Anti-Borrelia-8 IgM

Line Immunoassay for detection of IgG or IgM antibodies to
Borrelia burgdorferi sensu lato in human serum or plasma

 LIA-006-8 G	 20	 LIA-006-8 G-12	 12x 20	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	
 LIA-006-8 M	 20	 LIA-006-8 M-12	 12x 20	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	



Seramun Diagnostica GmbH · Sprenhagener Straße 1 · 15754 Heidesee · Germany · www.seramun.com
phone +49 (0) 33767 79110 · fax +49 (0) 33767 79199 · info@seramun.com

Introduction

Lyme borreliosis is a systemic infectious disease with various clinical manifestations. The disease can be divided into 3 stages involving different organ systems. Cardinal symptoms of the first stage (4 to 8 weeks p. i.) are the erythema chronicum migrans and local or general lymphadenopathies (lymphadenosis cutis benigna). The clinical manifestations of the second stage (1 to 12 months p. i.) range from meningitis, meningopolyneuritis, encephalitis up to hemiparesis, myoneuralgia and arthralgia, especially knee joint arthritis. Cardiac manifestations like life-threatening myocarditis / pancarditis are rarely detected. The third stage (months to years p. i.) is characterized by chronic infection of the nervous system (neuroborreliosis, progressive encephalomyelitis), the skin (acrodermatitis chronica atrophicans) and the joints (chronic erosive arthritis). Especially late manifestations of Lyme borreliosis can reduce quality of life and antibiotic treatment is difficult. Therefore an early diagnosis of borrelia infections is of great importance.

The infectious agent of Lyme disease was isolated from ticks in 1982 by BURGDORFER. It belongs to spirochetes and represents the independent genus *Borrelia*. The tick species *Ixodes ricinus* is the main vector of *Borrelia burgdorferi* in Europe. The occurrence of ticks within densely wooded rural areas correlates with the frequency of Lyme disease cases with a peak in the summer and autumn months. While the tick is taking blood from the host the *Borrelia* are transmitted from the contents of the tick's intestine. Persons at risk for *Borrelia* infections are people who work in forestry or agriculture, hunters and campers, soldiers and all people who occasionally spend time in wooded areas. The incidence of Lyme disease reaches from 2 to 40 / 100 000 in middle Germany to 300 / 100 000 in Austria. The estimated number of unrecognized cases is presumably higher, because a tick bite is not always recognized and the typical erythema chronicum migrans only develops in about 50% of *Borrelia* infections.

The direct detection of the infectious agent via culture from blood, cerebral spinal fluid (CSF) or skin biopsies undoubtedly represents the safest method for diagnosis of Lyme disease. Unfortunately this method is hampered by the long reproduction time of the *Borrelia*, the complexity of the culture medium and the relatively low sensitivity in case of culture from patient material. Thus culture as well as *Borrelia* detection from tissue sections via immunohistological methods are not suitable for routine diagnosis. Methods of choice are detection of IgG and/or IgM antibodies via immunofluorescence or enzyme immunoassay (ELISA). The ELISAs use *Borrelia* sonicates, partially purified or recombinant antigens for plate coating. Because of the regionally differing occurrence of subtypes (genospecies) and the known variability of the cell surface proteins of *Borrelia burgdorferi*, antigen mixtures are often preferred. Confirmatory tests like western blot, dot blot or line assay are essential and the serological test results have to be interpreted together with the clinical picture. Negative test results do not exclude Lyme disease (early stage of infection, seronegative cases).

Literature:

1. Hauser, U., Lehnert, G., Lobentanzer, R., Wilske, B., Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato J. Clin. Microbiol. 1997, 35: 1433-1444
2. 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
3. Kamradt, T., Krause, A., Priem, S., Burmester, G. R., Die Lyme-Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie, Dt. Ärzteblatt 1998, 95: 214-219
4. 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 (IR₆) 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

Intended use

The *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM is an in vitro diagnostic device (Line Immunoassay, LIA) for the detection of specific IgG or IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* in human serum or plasma samples. It should be used as a confirmatory test after a positive ELISA result.

Principle of the test

The antigens are plotted on nitrocellulose membranes and blocked to avoid unspecific reactions. After this procedure the membrane is cut into strips. The reaction for detection of specific antibodies is performed in 3 steps:

Step 1

The test strips are incubated in the diluted (1 : 101) serum or plasma samples for 45 minutes. Specific antibodies present in the samples react with the membrane bound antigens during that time. After incubation unbound proteins are removed by 3 washing cycles.

Step 2

The second incubation starts with the addition of enzyme labelled, isotype specific conjugate antibodies to the nitrocellulose strips. After 45 minutes of incubation unbound conjugate is removed by 3 washing cycles.

Step 3

The addition of the colourless precipitating substrate stains the membrane bound immune complexes by formation of blue precipitates. The reaction is stopped after 10 minutes by aspirating the substrate followed by rinsing the strips with sufficient quantity of distilled or deionized water.

After drying the strips, interpretation of the resulting pattern is done by comparison with the specific template. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software.

Used Borrelia antigens

Nomenclature*	Properties / Specificity	Origin
p100	Protein of surface membrane-vesicles	high specific <i>B. afzelii</i>
VlsE	variable major protein-like sequence Expressed	specific <i>B. afzelii</i>
p58	not characterized	specific <i>B. garinii</i>
p41 (Flagellin)	structural protein of endoflagellin	unspecific <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>
p39 (BmpA)	Flagella complex Borrelia membrane protein A	specific <i>B. afzelii</i>
p31 (OspA)	Outer surface protein A	specific <i>B. afzelii</i>
p23 (OspC)	Outer surface protein C, Mix from different Borrelia subtypes	high specific <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. garinii II</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. spielmanii</i>
p18 (DbpA)	Decorin binding protein A	specific <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> , <i>B. spielmanii</i>

* The nomenclature for some bands is not consistently used in the literature concerning molecular mass and specificity, respectively (2, 5, 7)

Preparation and storage of samples

Serum or plasma (EDTA, citrate or heparin plasma) can be used. Samples have to be diluted 1 : 101 (15 µl sample and 1500 µl WIB) with the ready to use wash and incubation solution (prepared from concentrated WIB (2)) in the incubation tray. Sample collection should be done in a sterile manner. Samples can be stored at 2...8°C for a maximum of 48 hours. For longer storage times samples have to be stored at -20°C. Frozen samples have to be warmed to room temperature and mixed well before starting the test run. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Kit components

			for 20 determinations	for 12 x 20 determinations
1	TESTSTR	test strips incl. evaluation template	20 strips colour coded: dark blue	12 x 20 strips colour coded: dark blue
2	WIB CONC 5x	wash and incubation buffer 5-fold	70 ml concentrate, transparent bottle, black cap	12 x 70 ml concentrate, transparent bottle, black cap
3	CONJ HRP IgG CONJ HRP IgM	anti-human IgG-HRP-conjugate or anti-human IgM-HRP-conjugate	35 ml, ready to use, IgG, coloured red, transparent bottle, red cap IgM, coloured green, transparent bottle, green cap	12 x 35 ml, ready to use, IgG, coloured red, transparent bottle, red cap IgM, coloured green, transparent bottle, green cap
4	SUBSTR TMB	substrate 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	35 ml, ready to use, black bottle, blue cap	12 x 35 ml, ready to use, black bottle, blue cap
5	INCUTRAY	incubation tray with cover	2	-

Materials required but not provided

• glassware • pipettes and tips for 15 µl and 1500 µl • plastic forceps • rocking platform (vertical)
 • filter paper • collecting devices for infectious material • distilled or deionized water • incubation trays (▽ 12 x 20)

Preparation and storage of reagents

Kit size and expiry

One kit is designed for 20 or 12 x 20 determinations. The complete test kit with closed reagent bottles is stable until the expiry date printed on the labels when stored at 2...8°C. After opening and proper storage as requested the reagents have to be used within 3 months.

Reagent preparation

Allow all components to reach room temperature prior to use in the assay. Ready to use wash and incubation solution has to be prepared from the 5-fold concentrated WIB (2) by dilution of 1 : 5 with distilled water. Mix the concentrate before dilution.

For example: 20 ml WIB (5-fold) + 80 ml distilled water

Assay procedure

- The test has to be performed at room temperature (18...25°C).
- The test strips have to be transferred into the incubation tray by use of plastic forceps in a way that the printed strip number on the top is visible.
- All incubation steps should be done on a rocking platform with a recommended frequency of rocking of about 20 - 30 rotations per minute.
- The following procedure has to adhere strictly to the time table.

Working steps

1. Incubate the test strips with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)) on a rocking platform for **5 min**.
2. Add **15 µl** sample.
3. Cover the incubation tray and incubate for **45 min** on a rocking platform.
4. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
5. Add **1.5 ml** **CONJ HRP**
6. Cover the incubation tray and incubate **45 min** on a rocking platform.
7. Aspirate and wash **3 x 5 min** with **1.5 ml** wash and incubation solution (ready to use, prepared from (2)).
8. Incubate the test strips with **1.5 ml** **SUBSTR TMB** **10 min** on a rocking platform.
9. Aspirate substrate and rinse the test strips **3 x** with **1.5 ml** distilled water to stop the reaction.
10. The developed test strips have to be dried between filter paper before evaluation.

Please Note:

With so-called „problematic“ samples (e.g. from patients with hypergammaglobulinaemia, circulating immune complexes, antibodies to milk proteins) the background develops rapidly and the test strips discolour blue. In such cases the substrate reaction has to be terminated earlier.

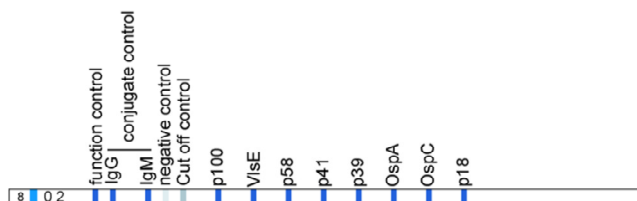
Test evaluation

Test validity

The *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM test strips contain 5 consecutive control lines beneath the strip number:

- Function control (positive reaction with every sample).
- Conjugate controls IgG and IgM (positive reaction with the corresponding conjugate).
Note: The other conjugate control band may develop a weak, non-specific colour.
- Negative control (band intensity must be less than the Cut off control).
- Cut off control (band intensity is used for result evaluation of the diagnostic bands).

The test run is valid if the function control, the corresponding conjugate control and the Cut off control are clearly visible.



Result interpretation

Generally the evaluation of the test has to be done with dried strips. To support identification of stained bands the evaluation template should be used. The identified bands have to be documented on the data sheet. Alternatively the strips can be evaluated with the *Seraline*[®] scan software. Judgement of the bands is performed according to the following classification:

Result interpretation	IgG	IgM
negative	max. 1 band except for VlsE > Cut off control	no bands except for p41 > Cut off control
borderline	VlsE or 1 band + p41 ≥ Cut off control	1 band except for OspC or p41 or p18 ≥ Cut off control
positive	2 bands except for p41 ≥ Cut off control	OspC or p18 or 2 other bands ≥ Cut off control

Inverse bands (bright bands on dark background) should be evaluated as negative. The respective serum should always be examined using other serological methods.

The cross-reaction between *Borrelia* and other spirochaetes may lead to the occurrence of *Borrelia*-associated bands in the Line Immunoassay, what may finally cause a false positive result. Samples of patients with the following infections may cross-react: Syphilis (*Treponema pallidum*), Framboesie (*Treponema pertenue*), Leptospirosis (*Leptospira spec.*) and relapsing fever (*Borrelia spec.*).

Within the context of EBV primary infections antibody reactivities against *Borrelia burgdorferi* sensu lato antigens due to polyclonal b-cell stimulation, may occur.

Performance characteristics

Sensitivity

Panel 1:

Serum samples (n = 78) from patients with suspect of Lyme Borreliosis were investigated in a comparative study using *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM and another commercial Line Immunoassay.

n = 78		commercial – Line Immunoassay	
		positive	negative
<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8	positive	51	10
	negative	1	16

A total of 67 samples delivered concordant results in both assays which means an overall agreement of 85.9% and a comparative sensitivity of 98.1% for the *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG/IgM in relation to the commercial assay. Samples with discordant results (n=11) were reinvestigated by Immunoblot (*Serablot*[®] Anti-Borrelia IgG/ IgM and another commercial Line Immunoassay). The *Seraline*[®] results were confirmed by Immunoblot for 8 of 10 positive samples. One discrepant sample (*Seraline*[®] negative, comparative test positive) was determined weak positive by Western Blot (*Serablot*[®]).

Panel 2:

Serum samples from persons with suspect of acute Borrelia infection (n = 32) were investigated for the presence of IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* by use of the *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM and another commercially available Line Immunoassay.

n = 32		commercial – Line Immunoassay IgM	
		positive	negative
<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8 IgM	positive	9	8
	negative	0	15

24 samples show identical results. In comparison to the commercial assay a sensitivity of 100% is achieved. All 8 samples showing discrepant results were reinvestigated by Immunoblot (*Serablot*[®] Anti-Borrelia IgM). Six of these samples were confirmed positive.

Specificity

A population of 400 healthy blood donors was investigated to determine the specificity of *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG and *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM Line Immunoassays.

Out of this population 47 (39 positive and 8 borderline) serum samples were determined positive for IgG and 22 (17 positive and 5 borderline) serum samples were determined positive for IgM antibodies with the *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG and *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM resp. resulting in a specificity of

Specificity IgG: 88.2% Specificity IgM: 94.5%

Limitations of the procedure

The final result interpretation should always consider clinical findings. Individual cases may require repeated investigations of samples taken at intervals of several weeks. As in other Immunoassays, impurities and cross contamination of reagents and samples by fungi or bacteria can produce false positive as well as false negative results. Incorrect dilution of samples, incorrect washing of the test strips or insufficient rinsing after substrate reaction and also incorrect timing can produce erroneous results.

Interference

Hemolytic, lipemic and icteric samples did not interfere with the test up to a concentration of 500 mg/dl (hemoglobin), 1000 mg/dl (lipids) and 20 mg/dl (bilirubin C and bilirubin F). Rheumatoid factors did not interfere up to a concentration of 500 IU/ml.

Cross reactivity

Serum samples (n = 195) from patients with potential cross reactive antibodies were investigated in a study using *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgG / *Seraline*[®] Anti-Borrelia-8 IgM.

The result evaluation of IgG and IgM antibody detection is shown in the following table.

n=195		<i>Seraline</i> [®] Anti-Borrelia-8		
		positive	borderline	negative
ANA	(n=51)	7	3	41
EBV	(n=30)	3	0	27
CMV	(n=67)	13	2	52
Syphilis	(n=47)	4	1	42

Common advices and precautions

This kit is for *in-vitro* use only. Follow the working instruction carefully. The test should be performed by trained technical laboratory staff only. The test instructions have to be followed strictly. Do not use reagents from damaged packages or bottles. Handle the test strips with plastic forceps only. Prior to testing the identification numbers of the samples, the numbers of the test strips and the lot number of the kit should be documented on the data sheet. The expiry dates stated on the respective labels are to be observed.

Do not use or mix reagents from different lots except for wash and incubation buffer and for substrate.

Do not use reagents from other manufacturers to complete the kit. Some of the reagents may contain biocides as preservative. Further information can be found in the safety data sheet. They must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucous membranes. In case of contact immediately remove by rinsing with water. All reagents should be stored at 2...8°C. Handle all components and all patient samples as if potentially hazardous.

Since the kit contains potentially hazardous materials, the following precautions should be observed:

- **Do not smoke, eat or drink while handling kit material!**
- **Never pipette by mouth!**
- **Always use protective gloves!**
- **Note safety precautions of the single test components!**



History of changes

Version	Section	Modifications
2018-03-15	Common advices and precautions	Update



Manufacturer



Catalogue-No.



Lot-No.



Number of determinations



Biohazard



Notice advices



Use by



Storage temperature



Consult instructions for use