

## Produkt- und Gebrauchsinformation

# Serazym<sup>®</sup>

## Anti-Borrelia-IgM








REF E-023  
Σ 96



IVD

In-vitro-Diagnostikum

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

<b>REF</b>	Bestell- Nr.	<b>LOT</b>	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 (Lymphadenitis cutis benigna). Die klinischen Erscheinungen des 2. Stadiums (1-12 Monate) äußern sich als Meningitis, Meningopolyneuritis, Encephalitis 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 relativ 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 BURGENDORFER et al. aus Zecken isolierte Spirochäte, die der Familie der Borrelien zugeordnet wurde. Hauptvektor von *Borr. burgdorferi* in Europa ist der Gemeine Holzbock *Ixodes ricinus*. Entsprechend dem Auftreten 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 hoch, da ein Zeckenbiß nicht immer bemerkt wird oder erinnerlich ist und sich das typische Erythema chronicum migrans nur in etwa 50 % der *Borr.burgd.*-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. Methoden der Wahl sind deshalb der Nachweis von IgG- und/oder IgM-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz oder Enzymimmunoassay. In ELISA werden Borrelien-Sonikate, Extrakte oder partiell gereinigte 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 sind Blot-Methoden (Westernblot, Dotblot, 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 (IR<sub>8</sub>) 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*<sup>®</sup> Anti-*Borrelia*-IgM ist ein in-vitro-Diagnostikum zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in humanen Serum- oder Plasmaproben.

## Testprinzip

Der *Serazym*<sup>®</sup> Anti-*Borrelia*-IgM ist ein Festphasen 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 sowie Positiv- und Negativ-Kontrollen werden in die mit *Borrelia burgdorferi* Antigenen beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterstreifen dosiert.

Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C werden die ungebundenen Komponenten aus den Vertiefungen abgesaugt und die Vertiefungen 3 mal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von anti-Human-IgM-POD-Konjugat wird 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend erneut 3 mal gewaschen.

Anschließend werden die Vertiefungen mit Substrat (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) für die enzymatische Reaktion gefüllt. Nach 15 Minuten Reaktionszeit bei 37 °C erfolgt der Reaktionsstopp durch Zugabe von Schwefelsäure in die Vertiefungen. Blaugefärbte Produktlösungen verfärben sich dadurch gelb.

Die Extinktion der gelben Lösungen wird durch Vertikalphotometrie bei 450 nm Wellenlänge oder besser durch Subtraktionswellenlängenmessung 450 nm minus 620 nm Extinktion bestimmt. Die Auswertung erfolgt unter Bezug auf die Extinktionen der mitgeführten Kontrollen.

## Vorbereitung und Lagerung der Proben

Serum/Plasma sowie andere biologische Materialien können mit dem *Serazym*<sup>®</sup> Anti-*Borrelia*-IgM auf ihren Gehalt an anti-*Borrelia burgdorferi*-IgM-Antikörpern 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 Frieren und Tauen ist zu vermeiden.

## Testkomponenten für 96 Kavitäten

<b>1</b> <b>WELLS</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit 12 teilbaren Streifen zu je 8 Kavitäten (insg. 96) beschichtet mit gereinigten <i>Borrelia afzelii</i> Antigenen inklusive eines VlsE Zusatzes	1 vakuumversiegelt mit Trockenbeutel
<b>2</b> <b>WASHBUF CONC 10X</b>	<b>Waschpuffer, 10-fach</b> für 1000 ml Lösung	100 ml Konzentrat, weiße Kappe
<b>3</b> <b>DIL</b>	<b>Verdünnungsmedium</b>	100 ml gebrauchsfertig, schwarze Kappe
<b>4</b> <b>CONTROL +</b>	<b>Positiv-Kontrolle</b>	1,0 ml gebrauchsfertig, rote Kappe
<b>5</b> <b>CONTROL -</b>	<b>Negativ-Kontrolle</b>	1,0 ml gebrauchsfertig, grüne Kappe
<b>6</b> <b>CONJ HRP</b>	<b>POD-Konjugat</b> POD-markierte polyklonale Antikörper (Schaf)	15 ml gebrauchsfertig, grüne Kappe
<b>7</b> <b>SUBSTR TMB</b>	<b>Substrat</b> Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	15 ml gebrauchsfertig, blaue Kappe
<b>8</b> <b>STOP</b>	<b>StoppLösung</b> 0,25 M Schwefelsäure	15 ml gebrauchsfertig, gelbe Kappe

## Für die Testdurchführung zusätzlich benötigte Materialien und Hilfsmittel

- verstellbare Einkanal Mikropipetten 0,001 – 1,000 ml
- verstellbare 8-Kanal Pipette 0,050 – 0,200 ml
- Meßzylinder
- Bechergläser
- Eppendorfröhrchen
- 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 oder 690 nm Filtern
- destilliertes Wasser

## Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

### Testbesteckformat und Haltbarkeit

Ein Testbesteck (1X96 Vertiefungen) erlaubt die Bestimmung von anti-*Borrelia burgdorferi*-IgM-Antikörpern in maximal 94 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 2 Monate 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 + 0,5 ml Verdünnungsmedium (3)**

**Die Reihenfolge der Pipettierschritte und deren Durchführung im Zeittakt sind einzuhalten!**

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

#### Achtung:

**Im Falle einer automatischen Abarbeitung mit Hilfe eines Mikrotiterplatten ELISA Systems wird 5-maliges Waschen der Kavitäten (anstelle von 3-maliges Waschen) bei jedem Waschschrift empfohlen.**

## Arbeitsschritte

1. Die Testreagenzien und die benötigte Anzahl an Kavitäten auf RT erwärmen und alle Reagenzien vor Gebrauch schütteln.
2. **100 µl CONTROL + (4), 100 µl CONTROL – (5)** bzw. 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 (6)** 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 (7)** pipettieren.
9. **15 min** lichtgeschützt bei 37 °C inkubieren.
10. **100 µl STOP (8)** 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

### Ermittlung des Grenzwertes und der Grauzone

Die Grenzwertextinktion errechnet sich aus:  
Extinktionsmittelwert Negativ-Kontrolle + 0,40  
Extinktionseinheiten

Die Grauzone erstreckt sich auf den Bereich:  
0,9 x Extinktion Grenzwert bis  
Grenzwertextinktion

## Bewertung der Proben

### Serazym<sup>®</sup> Anti-Borrelia-IgM

<b>Negativ</b>	<b>&lt; 0,9 x Grenzwert</b>
<b>Positiv</b>	<b>&gt; Grenzwert</b>

Proben mit Extinktionen im Bereich der Grauzone sollten erneut im ELISA bestimmt werden. Gegebenenfalls empfiehlt es sich eine weitere, in 1-2wöchigem Abstand entnommene Serumprobe zu untersuchen.

### Testvalidierung

Der Test kann ausgewertet werden, wenn:

- Extinktion der Negativ-Kontrolle ≤ 0,15
- Extinktion der Positiv-Kontrolle ≥ 1,30

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.

### Grenzen der Methode

Die Immunantwort bei der Borreliose folgt bestimmten Gesetzmäßigkeiten. Die frühe Antikörperbildung richtet sich zuerst gegen das äußere Membranprotein C und das Flagellenprotein als Hauptprotein. 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.  
Des Weiteren können IgM-Antikörper neben IgG-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* mitunter monatelang persistieren.

Eine Interpretation des Ergebnisses sollte deshalb 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*-IgM-Antikörpern im ELISA sollten durch Bestätigungstests (z.B. Western blot) 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) im *Serazym*<sup>®</sup> Anti-Borrelia-IgM aus 8fach Bestimmungen von Proben:

Probe	OD-Mittelwert	VK (%)
Serum 1	0,85	3,6
Serum 2	1,22	5,1
Serum 3	1,79	4,6

Inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) im *Serazym*<sup>®</sup> Anti-Borrelia-IgM in 10 differenten Ansätzen aus 3fach-Bestimmungen der Proben:

Probe	OD-Mittelwert	VK (%)
Serum 4	0,78	4,7
Serum 5	1,13	4,8
Serum 6	1,85	5,7

### *Serazym*<sup>®</sup> Anti-Borrelia- IgM versus Vergleichstest

Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse von 37 Seren im *Serazym*<sup>®</sup> Anti-Borrelia-IgM und einem anderen kommerziellen Vergleichstest. Die Ergebnisse zeigen 89 % Übereinstimmung.

		Vergleichstest	
		positiv	negativ
<i>Serazym</i> <sup>®</sup> Anti- Borrelia IgM	positiv	20	3
	negativ	1	13

### Spezifität und Sensitivität

Die Angaben zur Spezifität und Sensitivität des *Serazym*<sup>®</sup> Anti-Borrelia-IgM wurden mit Hilfe eines Kollektivs von mehr als 1000 klinisch unauffälligen Seren und 70 Serumproben mit klinischer Diagnose einer Borreliose erhoben.

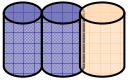
Danach beträgt die Testsensitivität 91 % und die Testspezifität 96 %.

## Inkubationsschema

### Serazym® Anti-Borrelia-IgM



100 µl **CONTROL + (4)**  
 100 µl **CONTROL - (5)**  
 100 µl **extern 1 : 101 verdünnte Serumprobe**



30 min Inkubation (37 °C)



3 X Waschen mit Waschlösung



100 µl **CONJ HRP (6)**



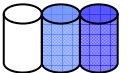
30 min Inkubation (37 °C)



3 X Waschen mit Waschlösung



100 µl **SUBSTR TMB (7)**



15 min Inkubation im Dunkeln (37 °C)



100 µl **STOP (8)**



Messung der Extinktionen bei 450/620 nm

## 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!