

DE

Anti-B. burgdorferi IgG

REF**3Z9651G
SM3Z9651G****IVD****Rx Only**

VERWENDUNGSZWECK

Das Anti-B. burgdorferi IgG ist ein ELISA-basiertes Testsystem für den qualitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in Humanserum. Dieses Testsystem ist für die Untersuchung von Serumproben symptomatischer Patienten bzw. solcher mit Verdacht auf Lyme-Krankheit vorgesehen.

Positive und fragwürdige Testergebnisse mit dem Anti-B. burgdorferi IgG auf Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* müssen durch weitere Tests mit einem der folgenden Ansätze bestätigt werden:

- (1) Standardmäßige zweistufige Testmethode (standard two-tier test, STTT) mit dem Western-Blot-Test auf IgG gemäß aktuellen Leitlinien
oder
- (2) Modifizierte zweistufige Testmethode (modified two-tier test, MTTT) mit dem Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM.

Positive Testergebnisse mit der STTT- oder der MTTT- Methode sind Belege für die Anwesenheit von Antikörpern und den Kontakt mit *Borrelia burgdorferi*, welches die Lyme-Krankheit verursacht. Die Diagnose von Lyme-Krankheit sollte auf Grundlage von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Vorgeschichte, Symptomen und sonstigen Labordaten gestellt werden.

HINTERGRUND

Borrelia burgdorferi ist eine Spirochäte, die Lyme-Krankheit verursacht. Der Organismus wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen. In endemischen Gebieten sind Zecken auf Pflanzen oder Tieren, wie Rotwild, Mäusen, Hunden, Pferden und Vögeln zu finden. Infektionen mit *B. burgdorferi* und andere Spirochäteninfektionen (Erkrankungen durch drei Gattungen beim Menschen: *Treponema*, *Borrelia* und *Leptospira*) haben gemeinsame Merkmale. Die Haut ist der Eintrittsort für *B. burgdorferi* und der Zeckenbiss verursacht oftmals einen charakteristischen Hautausschlag, der *Erythema migrans* (EM) genannt wird. EM entwickelt sich um die Zeckenbissstelle bei 60 % bis 80 % der Patienten. Eine Spirochätämie mit weitreichender Dissemination durch Gewebe und Körperflüssigkeiten erfolgt im frühen Krankheitsstadium.

Die Lyme-Krankheit tritt in Stadien auf, oftmals mit dazwischenliegenden Latenzperioden und mit unterschiedlichen klinischen Manifestationen. Die Lyme-Krankheit besteht im Allgemeinen aus drei Krankheitsstadien, deren Symptome sich oftmals überlappen. Die Symptome variieren je nach betroffenem Körperbereich der Infektion, wie Gelenke, Haut, Zentralnervensystem, Herz, Augen, Knochen, Milz und Nieren. Das späte Krankheitsstadium ist oft mit Arthritis oder ZNS-Symptomen verbunden. Asymptomatische subklinische Infektionen sind möglich, und die Infektion wird unter Umständen erst in den späteren Stadien klinisch manifest.

Patienten im Frühstadium der Infektion produzieren IgM-Antikörper in den ersten Wochen nach Auftreten des EM, und IgG-Antikörper werden langsamer gebildet (1). Sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper können über viele Jahre nachweisbar bleiben.

Die Isolierung von *B. burgdorferi* aus Hautbiopsieproben, Blut und Spinalflüssigkeit wurde in Veröffentlichungen berichtet (2). Diese direkten Kulturnachweismethoden können jedoch zur Massendiagnose der Lyme-Krankheit unpraktisch sein. Serologische Testmethoden zum Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* umfassen den indirekten Immunfluoreszenz-Assay (IFA), den Immunblot und den Enzymimmunoassay (EIA).

B. burgdorferi ist eine antigenetisch komplexe Spezies mit Stämmen, die sich stark unterscheiden. Frühe Antikörperreaktionen sind oftmals gegen Flagellin gerichtet, das kreuzreaktive Bestandteile besitzt. Patienten im frühen Infektionsstadium produzieren unter Umständen keine nachweisbaren Konzentrationen von Antikörpern. Außerdem kann eine frühzeitige Antibiotikumtherapie nach EM-Ausbruch eine gute Antikörperreaktion abschwächen oder aufheben. Einige Patienten produzieren unter Umständen niemals nachweisbare Antikörperkonzentrationen. Erfahrungsgemäß ist die Empfindlichkeit und Spezifität serologischer Tests auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* gering. Aufgrund dieser Ungenauigkeit kann die Diagnose Lyme-Krankheit nicht alleine auf der Basis dieser Tests gestellt werden (3, 4).

Im Jahr 1994 empfahl die Second National Conference on Serological diagnosis of Lyme disease ein zweistufiges Testsystem zum Zweck der Standardisierung von serologischen Labortests für den Nachweis von *B. burgdorferi*. Weil die EIA- und IFA-Methode für die

Erhärtung der klinischen Diagnose zu unspezifisch sind, wurde empfohlen, positive oder fragwürdige Ergebnisse eines sensitiven EIA oder IFA (erster Schritt) zusätzlich mit einer standardisierten Western-Blot-Methode (zweiter Schritt) auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* zu testen (Western-Blot-Tests auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* sind nicht als Bestätigung, sondern als Ergänzung anzusehen, weil ihre Spezifität suboptimal ist, insbesondere zum Nachweis von IgM). Positive zweistufige Ergebnisse sprechen für einen erfolgten Kontakt mit *B. burgdorferi*, der die klinische Diagnose von Lyme-Krankheit erhärten könnte, aber nicht als einziges Kriterium für die Diagnose herangezogen werden sollte. Dieses Szenario wird gewöhnlich als standardmäßiges Protokoll für ein zweistufiges Verfahren (standard two-tier testing, STTT) bezeichnet. Jüngste Studien (17, 18, 19) haben gezeigt, dass die Verwendung eines zweiten ELISA-Tests statt eines Immunblots zum Nachweis für *Borrelia* ein modifiziertes Protokoll für ein zweistufiges Verfahren (modified two-tier testing, MTTT) ergeben kann, dessen Leistungsfähigkeit mit der STTT-Methode vergleichbar ist.

PRINZIP DES ASSAYS

Das Anti-*B. burgdorferi* IgG ist für den Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen *B. burgdorferi* im Humanserum konzipiert. Die Probenfelder der Kunststoff-Streifen werden durch passive Adsorption mit *Borrelia burgdorferi* als Ganzzellantigen sensitisiert. Dieses Testverfahren umfasst drei Inkubationsschritte:

1. Testseren (korrekt verdünnt) werden in den Antigen-beschichteten Probenfeldern inkubiert. Jeder Antigen-spezifische Antikörper in der Probe bindet an das immobilisierte Antigen. Die Platte wird gewaschen, um ungebundene Antikörper und andere Serumkomponenten zu entfernen.
2. Peroxidase-konjugiertes anti-humanes IgG (Ziege, spezifisch für Fc-Ketten) wird in die Felder gegeben und die Platte wird inkubiert. Das Konjugat reagiert mit dem IgG-Antikörper, der auf der soliden Phase in Schritt 1 immobilisiert wurde. Die Felder werden gewaschen, um nicht reagierendes Konjugat zu entfernen.
3. Die Probenfelder mit dem immobilisierten Peroxidase-Konjugat werden mit Peroxidase-Substratlösung inkubiert. Die Hydrolyse des Substrats durch Peroxidase bewirkt eine Farbänderung. Nach einer bestimmten Zeit wird die Reaktion gestoppt und die Farbintensität der Lösung fotometrisch gemessen. Die Farbintensität der Lösung hängt von der Antikörperkonzentration in der ursprünglichen Testprobe ab.

KOMPONENTEN DES TESTSYSTEMS

Materialien, die im Lieferumfang enthalten sind:

Jedes Testsystem enthält die folgenden Komponenten in ausreichenden Mengen, um die auf der Verpackung angegebene Anzahl von Tests durchzuführen. **HINWEIS:** Folgende Komponenten enthalten <0,1 % (Gewichtsprozent) Natriumazid als Konservierungsmittel: Kontrollflüssigkeiten, Kalibrierer und Probenverdünner.

Komponente	Menge	Beschreibung
	 1	Platte: Für 96 Bestimmungen vorgesehen. (12x8 Probenfelder); Streifen, die mit inaktiviertem <i>B. burgdorferi</i> (B31-Stamm)-Antigen beschichtet sind. Die Streifen sind in einem Streifenhalter verpackt und befinden sich in einem versiegelten Umschlag mit Trockenmittel.
	1	Konjugat: Konjugiertes (Meerrettich-Peroxidase) anti-humanes IgG (Ziege). 15-ml-Fläschchen mit weißem Deckel. Gebrauchsfertig.
	1	Positiv-Kontrollflüssigkeit (Humanserum): 0,35-ml-Fläschchen mit rotem Deckel. 21X konzentriert.
	1	Kalibrierer (Humanserum): 0,5-ml Fläschchen mit blauem Deckel. 21X konzentriert.
	1	Negativ-Kontrollflüssigkeit (Humanserum): 0,35-ml-Fläschchen mit grünem Deckel. 21X konzentriert.
	1	Probenverdünner: 30-ml-Flasche (grüner Deckel) mit Tween-20-Lösung, bovinem Serumalbumin und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung. Grüne Lösung. Gebrauchsfertig.
	1	TMB: 15-ml-Flasche (oranger Deckel) mit 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin (TMB). Gebrauchsfertig.

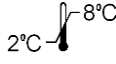
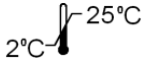
SOLN STOP	1	Stopplösung: 15-ml-Flasche (roter Deckel) mit 1M H ₂ SO ₄ , 0,7M HCl. Gebrauchsfertig.
WASH 10X	1	Waschpufferkonzentrat (10X): 1 Teil Konzentrat mit 9 Teilen deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. 100-ml-Flasche (durchsichtiger Deckel) mit einer 10fach-konzentrierten Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung und Tween-20-Lösung (blaue Lösung). HINWEIS: Die 1X-Lösung hat einen pH-Wert von 7,2 ± 0,2.

HINWEISE: Die folgenden Komponenten sind nicht Testsystem-Chargennummer-abhängig und können bei jedem ZEUS-ELISA-Test eingesetzt werden: TMB, Stopplösung und Waschpuffer.

BENÖTIGTE ABER NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN

- ELISA-Probenfeldleser mit Lesefähigkeit für eine Wellenlänge von 450 nm. **HINWEIS: Die Verwendung eines einzelnen (450 nm) oder dualen (450/620 – 650nm) Wellenlängenlesers ist zulässig. Zwei Wellenlängen werden bevorzugt, da der zusätzliche Referenzfilter potenzielle Interferenzen aufgrund von anomaler Lichtabsorption verringert.**
- Pipetten mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 10 µl bis 200 µl
- Multikanal-Pipette mit Fähigkeit zu präziser Abgabe von 50 µl bis 200 µl
- Reagenzreservoirs für Multikanal-Pipetten
- Waschflasche oder Probenfeld-Waschsystem
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Messzylinder, 1 Liter
- Serologische Pipetten
- Einweg-Pipettenspitzen
- Papierhandtücher
- Labor-Stoppuhr zur Überwachung der Inkubationsschritte
- Entsorgungsbassin und Desinfizierer (d. h. 10 % Haushaltsbleichmittel, 0,5 % Natriumhypochlorit)

AUFBEWAHRUNG

	Beschichtete Probenfelderstreifen: Nicht verwendete Streifen sofort wieder mit Trockenmittel versiegeln und korrekt lagern. Nach Öffnen des Umschlags – Streifen sind bis 60 Tage lang stabil, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel blau bleibt.
	Konjugat – NICHT EINFRIEREN.
	Ungeöffnetes Testsystem, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit, Negativ-Kontrollflüssigkeit, TMB, Probenverdünner
	Stopplösung: 2 °C bis 25°C Waschpuffer (1X): 20 °C bis 25°C bis zu 7 Tage, 2 °C bis 8°C 30 Tage lang. Waschpuffer (10X): 2 °C bis 25°C

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zum Gebrauch in *In-Vitro*-Diagnosen.
- Bei der Handhabung von Laborreagenzien normale Vorsichtsmaßnahmen einhalten. Bei Kontakt mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und ärztlichen Rat einholen. Angemessene Schutzkleidung, Handschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen. Dämpfe nicht einatmen. Bei der Entsorgung von Abfällen alle örtlichen und nationalen Gesetze befolgen.
- Die Felder auf der ELISA-Platte enthalten keine lebensfähigen Organismen. Dennoch sollten die Streifen als **potenzielle biologische Gefahrenstoffe** eingestuft und entsprechend behandelt werden.
- Die Kontrollflüssigkeiten sind **potenziell biologische Gefahrenstoffe**. Die Quellenmaterialien dieser Produkte wurden mit anerkannten Testmethoden negativ auf HIV-1-Antigen, HBsAg und auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet. Keine Testmethode kann jedoch eine komplette Gewähr dafür liefern, dass keine infektiösen Agenten vorhanden sind. Deshalb sind diese Produkte gemäß Biosicherheitsstufe 2 zu behandeln, wie für alle potenziell infektiösen humanen Serum- oder Blutproben in der aktuellen Ausgabe des Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ der Centers for Disease Control/National Institutes of Health und „Standard for Bloodborne Pathogens“ von OSHA empfohlen (5).
- Einhalten der angegebenen Inkubationszeit und Temperatur ist entscheidend für richtige Ergebnisse. **Alle Reagenzien müssen vor dem Test Zimmertemperatur (20 °C bis 25 °C) annehmen.** Nicht verbrauchte Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder auf Kühlschranktemperatur bringen.

6. Falsches Waschen kann falsche positive bzw. negative Resultate erzeugen. Sicherstellen, dass Waschmittelreste auf ein Minimum reduziert werden (z. B. durch Trocknen mit Papier oder Aspiration), bevor Konjugat oder Substrat zugefügt wird. Die Felder zwischen Inkubationen nicht austrocknen lassen.
7. Probenverdünnungsmittel, Kontrollflüssigkeiten und Kalibrierer enthalten <0,1 % (Gramm-Vol.-%) Natriumazid. Natriumazid bildet Blei- und Kupferazide in Laborabflussrohren, die bei Rohrleitungsschlägen Explosionen verursachen können. Um diese zu verhindern, Waschbecken nach dem Ausgießen von Natriumazid-haltigen Lösungen gründlich ausspülen.
8. Die Stopplösung ist bei Einatmen, Hautkontakt und Verschlucken GIFTIG. Sie kann Verbrennungen verursachen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort ärztlichen Rat einholen.
9. Die TMB-Lösung ist SCHÄDLICH. Es ist ein Reizmittel für Augen, Atmungssystem und Haut.
10. Das Waschpufferkonzentrat ist ein REIZMITTEL. Es ist ein Reizmittel für Augen, Atmungssystem und Haut.
11. Die Unterseite der Platte von Flüssigkeitsrückständen und/oder Fingerabdrücken, die die optische Dichteablesung stören könnten, sauber wischen.
12. Verdünnung oder Verpanschung dieser Reagenzien kann falsche Ergebnisse erzeugen.
13. Keine Reagenzien aus anderen Quellen oder von anderen Herstellern verwenden.
14. Die TMB-Lösung muss bei der Anwendung farblos, sehr hellgelb, sehr hellgrün oder sehr hellblau sein. Eine Kontamination der TMB-Lösung mit Konjugat oder anderen Oxidanzien führt zu einer vorzeitigen Farbänderung der Lösung. Die TMB-Lösung nicht verwenden, wenn sie merklich blau ist.
15. Niemals mit dem Mund pipettieren. Kontakt von Reagenzien und Patientenproben mit der Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
16. Mikrobielle Kontamination von Reagenzien vermeiden. Falsche Ergebnisse sind möglich.
17. Querkontamination von Reagenzien und/oder Proben kann fehlerhafte Ergebnisse erzeugen.
18. Wiederverwendbare Glasbehälter müssen gewaschen und gründlich von allen Detergenzien freigespült werden.
19. Spritzen oder Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
20. Reagenzien in der Aufbewahrung oder bei der Inkubation nicht starkem Licht aussetzen.
21. Die Probenfelderstreifen und den Halter vor dem Öffnen auf Zimmertemperatur kommen lassen. Der Schutzumschlag schützt die Felder vor Kondensation.
22. Die Waschlösung in einem Entsorgungsbassin sammeln. Die verbrauchte Lösung mit einem Desinfizierer (d. h. 10-prozentiger Haushaltsbleiche – 0,5 % Natriumhydrochlorit) behandeln. Reagenzien keinen Bleichdämpfen aussetzen.
23. Vorsicht: Flüssigkeitsabfälle mit saurem pH-Wert vor Zufügen in die Bleichlösung neutralisieren.
24. Die ELISA-Platte nicht verwenden, wenn der Indikatorstreifen auf dem Trockenmittelbeutel nicht blau, sondern rosa ist.
25. Konjugat nicht mit Behältern oder Instrumenten in Kontakt kommen lassen, die vorher eine Lösung mit Natriumazid als Konservierungsmittel enthalten haben könnten. Rückstände von Natriumazid können die Enzymaktivität des Konjugats unterbinden.
26. Die reaktiven Reagenzien nicht Lösungen mit Bleichmittel oder starken Gerüchen von Lösungen mit Bleichmittel aussetzen. Spuren von Bleichmittel (Natriumhypochlorit) können die biologische Aktivität vieler reaktiver Reagenzien in diesem Testsystem unterbinden.

PROBENAHEME

1. Es wird von ZEUS Scientific empfohlen, dass die Probenahme vom Benutzer in Übereinstimmung mit CLSI-Dokument M29: Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Aktuelle Ausgabe) erfolgt.
2. Keine Testmethode kann eine komplette Gewähr dafür liefern, dass humane Blutproben keine Infektionen übertragen. Deshalb müssen alle Blutderivate als potenziell infektiös behandelt werden.
3. Für diesen Test nur frisch entnommene und richtig gekühlte Seren verwenden, die mit zugelassenen aseptischen Venenpunkturnverfahren gewonnen wurden. Nicht verwenden, wenn Antikoagulanzen oder Konservierungsmittel zugefügt sind. Hämolytierte, lipemische oder bakteriell kontaminierte Seren vermeiden. Es ist die Verantwortung der einzelnen Labors, alle verfügbare Literatur und/oder eigenen Studien zur Bestimmung der Stabilitätskriterien für das eigene Labor zu verwenden (16).
4. Proben nicht länger als 8 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahren. Erfolgt der Test nicht innerhalb von 8 Stunden, können Seren zwischen 2 °C bis 8 °C bis zu 10 Tage. Wird eine Testverzögerung vorausgesehen, Testseren bei –20 °C oder darunter aufbewahren. Nicht mehrmals einfrieren/auftauen, weil dies zu einem Verlust der Antikörperaktivität und damit fehlerhaften Resultaten führen könnte.

ASSAY-VERFAHREN

1. Die verschiedenen Komponenten aus der Aufbewahrung holen und auf Zimmertemperatur (20 °C bis 25 °C) erwärmen lassen.
2. Die benötigte Anzahl Probenfelder feststellen. Sechs Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Festlegungen pro Test (eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit, drei Kalibrierer und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit) einplanen. Bei jedem Test eine Leerwertprobe testen. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Kontrollflüssigkeit/Kalibrierer-Konfiguration prüfen. Nicht verwendete Streifen in den wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel legen, versiegeln und wieder zwischen 2 °C und 8 °C lagern.

BEISPIEL PLATTENEINSTELLUNG		
	1	2
A	Leerwertprobe	Patient 3
B	Negativ-Kontrollflüssigkeit	Patient 4
C	Kalibrierer	usw.
D	Kalibrierer	
E	Kalibrierer	
F	Positiv-Kontrollflüssigkeit	
G	Patient 1	
H	Patient 2	

3. Eine Verdünnung von 1:21 (z. B. 10 µl Serum + 200 µl Probenverdünner) von Negativ-Kontrollflüssigkeit, Kalibrierer, Positiv-Kontrollflüssigkeit und dem Patientenserum herstellen.
4. In jedes Probenfeld 100 µl jeweils verdünnte Kontrollflüssigkeit, Kalibrierer und Patientenprobe zugeben. Sicherstellen, dass Proben gut durchmischt werden. Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
5. 100 µl Probenverdünner als Leerwertprobe in Feld A1 geben. Software- und Leseranforderungen für die korrekte Felderkonfiguration für die Leerwertprobe prüfen.
6. Platte bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) 25 ± 5 Minuten lang inkubieren.
7. Die Probenfelderstreifen 5-mal waschen.
 - a. **Waschen von Hand:**
 1. Die Flüssigkeit kräftig aus den Feldern ausschütteln.
 2. Jedes Probenfeld mit Waschpuffer füllen. Sicherstellen, dass die Felder keine Luftbläschen enthalten.
 3. Schritte 1. und 2. für insgesamt 5 Wäschen wiederholen.
 4. Die Waschlösung aus den Feldern ausschütteln. Die Platte auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen. Die Platte visuell auf evtl. verbleibende Waschlösung untersuchen. Waschlösung in einem Einweg-Bassin sammeln und am Ende der täglichen Tests mit Desinfizierer behandeln.
 - b. **Automatisches Waschen:**
 Bei Verwendung einer automatischen Probenfeld-Waschvorrichtung das Abgabevolumen auf 300 µl bis 350 µl pro Feld einstellen. Den Waschzyklus auf 5 Wäschen ohne Pause zwischen den Wäschen stellen. Falls nötig, die Probenfeldplatte aus dem Wäscher entnehmen, auf ein Papierhandtuch legen und kräftig klopfen, um alle Waschlösungsreste aus den Feldern zu entfernen.
8. 100 µl Konjugat mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
9. Platte bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) 25 ± 5 Minuten lang inkubieren.
10. Probenfelder gemäß Verfahren wie in Schritt 7 beschrieben waschen.
11. 100 µl TMB mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei den Proben in jedes Feld geben, einschließlich in das Feld mit Leerwertprobe.
12. Platte bei Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) 10 bis 15 Minuten lang inkubieren.
13. Reaktion durch Zufügen von 50 µl Stopplösung mit derselben Rate und Reihenfolge wie bei TMB in jedes Feld stoppen, einschließlich in dem Feld mit Leerwertprobe. Bei positiven Proben verändert sich die Farbe von blau zu gelb. Nach Zufügen der Stopplösung mehrmals an die Platte klopfen, um sicherzustellen, dass sich die Proben gut durchmischen.
14. Den Probenfeldleser auf eine Wellenlänge von 450 nm stellen und die optische Dichte jedes Felds gegen die Leerwertprobe messen. Die Platte innerhalb von 30 Minuten nach Zufügen der Stopplösung lesen.

TESTVERFAHREN IN KURZFORM

1. Serum 1:21 verdünnen.
2. Verdünntes Serum in Probenfelder geben – 100 µl/Feld.
3. —————→ 25 ± 5 Minuten inkubieren.
4. Waschen.
5. Konjugat zugeben – 100 µl/Feld.
6. —————→ 25 ± 5 Minuten inkubieren.
7. Waschen.
8. TMB zugeben – 100 µl/Feld.
9. —————→ 10 bis 15 Minuten inkubieren.

10. Stopplösung zugeben – 50 µl/Feld – Mischen.
11. Innerhalb von 30 Minuten ABLESEN.

QUALITÄTSKONTROLLE

1. Bei jedem Testverfahren muss der Kalibrierer dreifach angewendet werden. Eine Leerwertprobe, eine Negativ-Kontrollflüssigkeit und eine Positiv-Kontrollflüssigkeit müssen ebenfalls einbezogen werden.
2. Den Mittelwert der drei Kalibrierfelder berechnen. Weicht einer dieser drei Werte um mehr als 15 % vom Mittelwert ab, diesen Wert verwerfen und den Mittelwert der anderen beiden Felder berechnen.
3. Der Mittelwert der optischen Dichte für den Kalibrierer, für die Positiv- und Negativ-Kontrollflüssigkeiten muss in den folgenden Bereichen liegen:

Bereich der optischen Dichte

Negativ Kontrollflüssigkeit $\leq 0,250$

Kalibrierer $\geq 0,300$

Positiv-Kontrollflüssigkeit $\geq 0,500$

- a. Die optische Dichte der Negativ-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere optische Dichte des Kalibrierers muss $\leq 0,9$ ergeben.
- b. Die optische Dichte der Positiv-Kontrollflüssigkeit dividiert durch die mittlere optische Dichte des Kalibrierers muss $\geq 1,25$ ergeben.
- c. Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, muss der Test als ungültig gelten und wiederholt werden.
4. Die Positiv-Kontrollflüssigkeit und Negativ-Kontrollflüssigkeit dienen nur zur Überwachung eines erheblichen Reagenzversagens und garantieren keine Präzision am Test-Grenzwert.
5. Zusätzliche Kontrollflüssigkeiten können in Übereinstimmung mit Richtlinien oder Vorschriften von örtlichen oder staatlichen Stellen oder anerkannten Organisationen verwendet werden.
6. Siehe CLSI-Dokument C24: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures for guidance on appropriate QC practices.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. Berechnungen:

- a. *Korrekturfaktor*: Ein Grenzwert für den Wert der optischen Dichte von positiven Proben wurde vom Hersteller festgelegt und mit dem Kalibrierer korreliert. Der Korrekturfaktor ermöglicht die Festlegung des Grenzwerts für positive Proben. Er berücksichtigt auch leichte Abweichungen der Testresultate von Tag zu Tag. Der Korrekturfaktor wird für jede Charge von Komponenten festgelegt und ist auf das Datenetikett in der Testsystem-Box aufgedruckt.
- b. *Grenzwert der optischen Dichte*: Um den Grenzwert der optischen Dichte zu erhalten, den Korrekturfaktor mit dem oben berechneten mittleren Wert der optischen Dichte des Kalibrierers multiplizieren (*Korrekturfaktor x Mittelwert optische Dichte Kalibrierer = Grenzwert optische Dichte*).
- c. *Index-Werte/Raten der optischen Dichte*: Index-Wert/Rate der optischen Dichte für jede Probe durch Teilung des Werts der optischen Dichte durch den Grenzwert der optische Dichte aus Schritt b berechnen.

Beispiel: Mittelwert der optischen Dichte Kalibrierer = 0,793
 Korrekturfaktor = 0,25
 Grenzwert der optischen Dichte = $0,793 \times 0,25 = 0,198$
 Unbekannte optische Dichte der Proben = 0,432
 Indexwert/Rate der optischen Dichte der Probe = $0,432 / 0,198 = 2,18$

2. **Interpretationen:** Indexwerte/Raten der optischen Dichte werden wie folgt interpretiert.

	<u>Indexwert/Rate der optischen Dichte</u>
Negative Proben	$\leq 0,90$
Fragwürdige Proben	0,91 to 1,09
Positive Proben	$\geq 1,10$

- a. Eine Ratio der optischen Dichte von $\leq 0,90$ bedeutet, dass keine signifikante Menge an Antikörpern gegen *B. burgdorferi* IgG nachgewiesen wurde. Bei Verdacht auf Kontakt mit *B. burgdorferi* sollte eine zweite Probe gesammelt und zwei bis vier Wochen später getestet werden (15).
 - b. Eine Ratio der optischen Dichte von $\geq 1,10$ bedeutet, dass Antikörper, die spezifisch gegen *B. burgdorferi* gerichtet sind, nachgewiesen wurden. Dies bedeutet einen präsumptiven Beweis für einen wahrscheinlich stattgefundenen Kontakt. Gegenwärtigen Empfehlungen zufolge kann dieses Ergebnis ohne zusätzlichen Westernblot-Test nicht weiter interpretiert werden. Westernblot-Tests auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* sind nicht als Bestätigung, sondern als Ergänzung anzusehen, da ihre Spezifität, insbesondere zum Nachweis von IgM, suboptimal ist. Die Ergebnisse erst nach Durchführung des Zusatztests ausgeben.
 - c. Proben mit Werten der Ratio der optischen Dichte, die in den Bereich der Werte der fragwürdigen Proben fallen (0,91 – 1,09) sollten in doppelter Ausführung erneut getestet werden. Die beiden übereinstimmenden der drei Ergebnisse ausgeben. Wiederholt fragwürdige Proben mit dem zweiten Schritt des IgG- und/oder IgM-Western-Blot beurteilen.
3. **MTTT (2-EIA) Nutzung und Interpretation beim Nachweis von IgG-Antikörpern**
- Dieses Gerät kann außer zur Nutzung als Immunassay für die Erstmessung beim standardisierten zweistufigen Verfahren (standard two-tier testing, STTT) für die Zweitmessung im Rahmen des 2-EIA-Protokolls bzw. des modifizierten zweistufigen Verfahrens (modified two-tier testing, MTTT) wie folgt verwendet werden.
- a. Die Proben müssen zuerst mit dem Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM getestet werden.
 - b. Alle positiven und fragwürdigen Proben müssen dann mit diesem Anti-B. burgdorferi IgG getestet werden.
 - c. Positive und fragwürdige Ergebnisse der zweiten EIA-Testung sollten dann als positiv ausgegeben und als Beweis für die Anwesenheit von IgG-Antikörpern und erfolgtem Kontakt mit *B. burgdorferi* angesehen werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Die MTTT-Studie wurde mit dem Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM als Verfahren der ersten Stufe und dem Anti-B. burgdorferi IgG als Verfahren der zweiten Stufe durchgeführt, wobei die Tests in dieser Reihenfolge durchgeführt wurden. Die Leistungsmerkmale des Geräts sind für einen Wechsel der Testreihenfolge oder für die Substitution mit anderen EIA-Tests im MTTT (2-EIA)-Verfahren wurden noch nicht ermittelt.
2. Seren von Patienten mit anderen Spirochätenkrankheiten (Syphilis, Frambösie, Pinta, Leptospirose und Rückfallfieber) oder infektiöser Mononukleose und systemischem Lupus erythematoses können falsch-positive Ergebnisse liefern (8, 9). Bei Fällen von falsch-positiven Ergebnissen sollten eingehende klinisch-epidemiologische Untersuchungen und Labortests durchgeführt werden, um die genaue Diagnose zu ermitteln. Falsch-positive Seren von Syphilis-Patienten können anhand eines RPR-Tests und Tests auf Treponema-Antikörper bei solchen Proben identifiziert werden (10). Seren, die tatsächlich positiv für die Erkrankung durch *B. burgdorferi* sind, fallen bei diesen Tests negativ aus.
3. Falsch-negative Ergebnisse können erzielt werden, wenn Serumproben zu frühzeitig nach dem Krankheitsbeginn entnommen werden und die Antikörper noch keine bedeutenden Konzentrationen erreicht haben (8). Außerdem kann die Antikörperantwort auf die Spirochäte durch eine frühzeitige Antibiotikumtherapie abgebrochen werden (11).
4. Alle Daten sollten unter Berücksichtigung der klinischen Krankheitssymptome, epidemiologischer Daten, der Exposition in endemischen Gebieten und den Ergebnissen anderer Labortests interpretiert werden.
5. Screeningtests nicht an der allgemeinen Bevölkerung durchführen. Der positive Vorhersagewert hängt von der Wahrscheinlichkeit für eine Infektion.
 - ab. Den Test nur durchführen, wenn klinische Symptome vorhanden sind oder Verdacht auf einen Kontakt besteht.
6. Die Leistungsmerkmale des Anti-B. burgdorferi IgM bei Personen, die mit *B. burgdorferi*-Antigenen geimpft worden sind, wurden noch nicht ermittelt.

ERWARTETE ERGEBNISSE

Nur 10 % bis 40 % der Patienten mit EM als einzigem Symptom haben nachweisbare Konzentrationen von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* (1, 12 und 13). Die IgM-Antikörperantwort erreicht normalerweise drei bis sechs Wochen nach der Infektion ihren Höhepunkt und ist während der ersten beiden Infektionswochen oftmals nicht nachweisbar. Die IgG-Antikörperantwort ist oftmals erst nach vier bis sechs Wochen nach der Infektion nachweisbar. Ein vollständigeres serologisches Bild kann durch die Untersuchung von Akut- und Rekonvaleszentenseren erstellt werden. Die meisten Patienten (94 % bis 97%) mit neurologischen Komplikationen und praktisch alle Patienten mit Arthritis haben erhöhte IgG-Titer gegen die Spirochäte (14, 15). In späteren Stadien kann ein positiver Antikörpertest zur Unterscheidung zwischen Lyme-Krankheit und Virus-Meningitis oder unerklärten Nervenlähmungen herangezogen werden. Ein positiver Antikörpertest kann zur Unterscheidung zwischen Lyme-Arthritis und rheumatoider Arthritis, juveniler Arthritis und Reiter-Syndrom besonders hilfreich sein (11). Bei Patienten ohne Zeichen oder klinische Symptome der Lyme-Krankheit sollte mit dem Anti-B. burgdorferi IgG ein negatives Ergebnis erzielt werden.

LEISTUNGSSCHARAKTERISTIKA

1. Vergleichsstudien:

Das Anti-B. burgdorferi IgG wurde mit einem kommerziellen indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Test zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* verglichen. Zweihundertsieben (207) Serumproben wurden mit den beiden Verfahren getestet. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1:

Anti-B. burgdorferi IgG	<i>B. burgdorferi</i> IFA-Verfahren		
		positiv	negativ
	positiv	54	12
	negativ	2	133
	fragwürdig*	1	5

Relative Sensitivität = 96,4 % (54/56)

Relative Spezifität = 91,7 % (133/145)

Übereinstimmung = 93,0 % (187/201)

*Fragwürdige Proben wurden aus den Berechnungen für Sensitivität, Spezifität und Übereinstimmung ausgeschlossen.

Tabelle 2 zeigt die Testergebnisse, die mit einer Serumprobenreihe der CDC erzielt wurden. Die Ergebnisse werden angegeben, um weitere Informationen zur Leistung dieses Tests bei einer charakterisierten Blind-Serumprobenreihe bereitzustellen. Damit wird keine Unterstützung des Tests von Seiten der CDC angedeutet.

Tabelle 2: *B. burgdorferi*-Serumprobenreihe der CDC aufgegliedert nach dem Krankheitsbeginn

Zeit nach Krankheitsbeginn	positiv	fragwürdig	negativ	gesamt	% Übereinstimmung mit klinischer Diagnose
Normalseren	0	0	5	5	100
<1 Monat	1	1	4	6	20
1 bis 2 Monate	2	1	5	8	28
3 bis 12 Monate	8	3	9	20	47
>1 Jahr	8	0	0	8	100
gesamt	19	5	23	47	57

2. Präzision und Reproduzierbarkeit:

Um die Intra- und Inter-Assay-Variation des Testverfahrens zu beurteilen, wurden sieben Serumproben, die im Messbereich negativ bis hoch positiv lagen, mit dem Anti-B. burgdorferi IgG getestet. Jede Probe wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen in achtfacher Ausführung getestet. Anschließend wurde für jede Probe die mittlere Ratio der optischen Dichte und der Variationskoeffizient berechnet. Diese Daten sind nachfolgend dargestellt:

Tabelle 3:

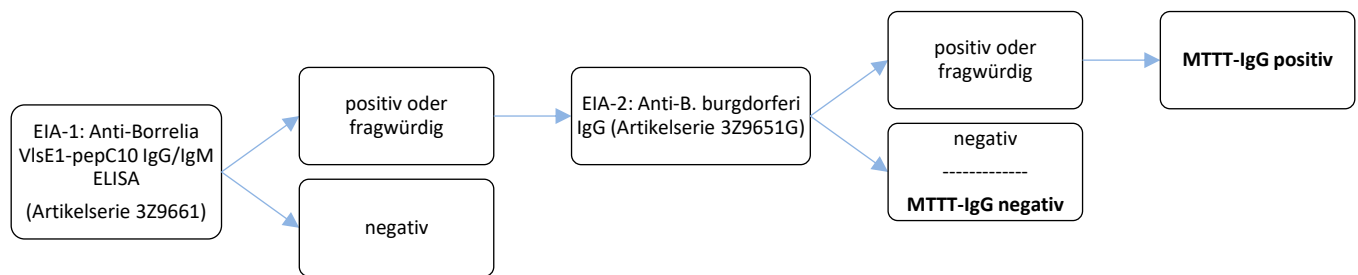
Tabelle 3:	Intra-Assay (n=8)						Inter-Assay (n=3)	
	Tag 1		Tag 2		Tag 3			
Probennumme r	mittlere Ratio	% VK	mittlere Ratio	% VK	mittlere Ratio	% VK	mittlere Ratio	% VK
1	1,75	8,2	1,76	6,0	1,50	9,6	1,67	7,2
2	1,22	3,9	1,21	6,5	1,12	3,4	1,18	3,8
3	4,25	2,8	4,30	6,7	3,84	2,1	4,13	5,0
4	2,73	3,5	3,14	2,1	2,53	4,1	2,80	9,1
5	2,69	2,5	2,97	7,1	2,64	4,3	2,77	15,2
6	0,49	5,5	0,60	5,1	0,59	8,1	0,56	8,9
7	0,35	7,4	0,43	2,1	0,39	8,1	0,39	8,4

3. Leistungscharakteristika MTTT (2-EIA)

Die folgenden Studien wurden durchgeführt, um die Leistungsfähigkeit des Anti-B. burgdorferi IgG s für die Zweitmessung im Rahmen des modifizierten zweistufigen Tests (modified two-tier testing, MTTT) bzw. des 2-EIA-Protokolls zu bestimmen.

- Methoden-Vergleich MTTT-IgG:** Das Anti-B. burgdorferi IgG wurde für die Zweitmessung im Rahmen des MTTT-Protokolls verwendet, wie im nachfolgenden Ablaufdiagramm dargestellt. Der EIA, der für die Erstmessung verwendet wurde, war das Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM. Die Leistungsfähigkeit von MTTT-IgG versus STTT wurde mit zwei separaten Kohorten bestimmt; einer retrospektiven Kohorte und einer prospektiven Kohorte.

Ablaufdiagramm: MTTT-IgG-Algorithmus



- b. **Retrospektive Kohorte:** Die retrospektive Kohorte mit 356 Proben setzte sich aus Proben von 280 Teilnehmern der Panelkategorie „Premarketing“ der CDC zusammen, die durch 46 Proben von Patienten mit Lyme-Krankheit im Stadium 2 und 30 Proben von Patienten mit Lyme-Krankheit im Stadium 3 ergänzt wurden. Die retrospektiven Serumproben stammten daher von 166 Teilnehmern mit Lyme-Krankheit (60 Stadium 1, 56 Stadium 2 und 50 Stadium 3), 90 Teilnehmern mit Krankheiten außer Lyme-Krankheit und 100 gesunden Kontrollen (50 endemisch und 50 nicht endemisch).

Zu Beginn wurden die 356 retrospektiven Proben mit dem Test für Erstmessung, dem Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM getestet. Es gab 160 positive und 6 fragwürdige Testergebnisse. Im Rahmen des STTT-IgG-Protokolls wurden die Proben, die positiv bzw. fragwürdig waren (n=166) mit dem B. burgdorferi IgG-Western-Blot getestet. Im Rahmen des MTTT-IgG-Protokolls wurden die Proben (n=166) mit einem zweiten EIA, dem Anti-B. burgdorferi IgG getestet. Die fragwürdigen und positiven Ergebnisse mit der EIA-Zweitmessung wurden als positiv angesehen. Die fragwürdigen und positiven Ergebnisse wurden addiert und die Ergebnisse mit den positiven Ergebnissen der STTT-IgG-Methode verglichen. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse des MTTT-IgG- im Vergleich mit dem STTT-IgG-Protokoll dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der mit der retrospektiven Kohorte gewonnenen Ergebnisse im Rahmen des MTTT-IgG- und STTT-(IgG)-Protokolls

	Stadium I (n=60)		Stadium II (n=56)		Stadium III (n=50)		gesunde Kontrollen (n=100)		Krankheitskontrolle n (n=90)	
	STTT-IgG	MTTT-IgG	STTT-IgG	MTTT-IgG	STTT-IgG	MTTT-IgG	STTT-IgG	MTTT-IgG	STTT-IgG	MTTT-IgG
Positiv	19	36	24	35	50	50	0	0	0	0
Negativ	41	24	32	21	0	0	100	100	90	90
Sensitivität bzw. positive prozentuale Übereinstimmung	31,7 %	60,0 %	42,9 %	62,5 %	100 %	100 %	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.
Spezifität oder negative prozentuale Übereinstimmung	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	100 %	100 %	100 %	100 %

- c. **Testen an prospektiver Kohorte:** Zusammenstellung einer prospektiven Kohorte aus Serumproben, die im Labor mittels routinemäßiger serologischer Testung auf *Borrellien* getestet wurden. Diese Proben stammten aus drei verschiedenen geografischen Regionen in den USA, alles Regionen, die für Lyme-Krankheit endemisch sind. In zweien dieser drei Gebiete (US-Bundesstaaten Massachusetts und Minnesota) wurden die Proben gesammelt und der jeweilige ELISA-Test durchgeführt. In einer Region (US-Bundesstaat Wisconsin) wurden die Proben gesammelt und an den Hersteller des jeweiligen ELISA-Tests geschickt. Die drei Regionen und ihre Anzahl Proben wurden in der nachstehenden Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammengefasste Daten der prospektiven Kohorte

Geografische Region	Stichprobengröße (n)
Massachusetts	900
Wisconsin	990
Minnesota	1042
Gesamt	2932

Zu Beginn wurden die 932 prospektiven Proben mit dem Test für Erstmessung, dem Anti-Borrelia VlsE1-pepC10 IgG/IgM getestet. Es gab 363 positive und 58 fragwürdige Testergebnisse. Im Rahmen des STTT-Protokolls wurden die Proben, die positiv bzw. fragwürdig waren (n=421), mit dem B. burgdorferi IgG-Western-Blot getestet. Im Rahmen des MTTT-IgG-Protokolls wurden die Proben (n=421) mit einem zweiten ELISA, dem Anti-B. burgdorferi IgG getestet. Die fragwürdigen und positiven Ergebnisse mit der EIA-Zweitmessung wurden als positiv angesehen. Die fragwürdigen und positiven Ergebnisse wurden addiert und die Ergebnisse mit den positiven Ergebnissen der STTT-Methode verglichen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit der STTT- (IgG) versus MTTT-IgG-Methode befindet sich in der nachstehenden Tabelle 6:

Tabelle 6: MTTT-IgG-Methode im Vergleich mit der STTT- (IgG)-Methode an der prospektiven Kohorte

		STTT- (IgG)		
		positiv	negativ	gesamt
MTTT-IgG	positiv	115	77**	192
	negativ	10*	2730	2740
	gesamt	125	2807	2932

Positive Übereinstimmung: 92,0 % (115/125) 95%-KI: 85,9 % – 95,6 %

Negative Übereinstimmung: 97,3 % (2730/2807) 95%-KI: 96,6 % – 97,8 %

**Von den 10 Proben, die STTT-IgG-positiv/MTTT-IgG-negativ waren, wiesen fünf keine klinischen Informationen auf, die mit der Lyme-Krankheit übereinstimmen, bei einer lag der Nachweis einer früheren Infektion vor, bei dreien lagen klinische Informationen vor, die mit der Lyme-Krankheit Stadium I übereinstimmen, und bei einer waren keine klinischen Daten verfügbar.

**Von den 77 Proben, die MTTT-G-positiv/STTT-G-negativ waren, wiesen 24 keine klinischen Informationen auf, die mit der Lyme-Krankheit übereinstimmen, bei dreien lag der Nachweis einer früheren Infektion vor, bei zweien lagen klinische Informationen vor, die mit der Lyme-Krankheit Stadium I übereinstimmen, und bei 48 waren keine klinischen Daten verfügbar.

LITERATUR

1. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, and Spielman A: Longitudinal assessment of the clinical and epidemiologic features of Lyme disease in a defined population. J. Infect. Dis. 154:295-300, 1986.
2. Rosenfeld MEA: Serodiagnosis of Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095, 1993.
3. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, and Marawista SE: The spirochetal etiology of Lyme disease. New Engl. J. Med. 308:733, 1983.
4. Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, and Schell RF: Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 patients in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologists Proficiency Testing Program. J. Clin. Microbiol. 35:537-543, 1997.
5. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens. Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
6. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture – Second edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.

GLOSSAR DER SYMBOLE

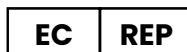
Bei der Kennzeichnung dieses Produkts wurden möglicherweise die folgenden Symbole verwendet.

Symbol	Description	Symbol	Description
	Hersteller		Von Sonnenlicht fernhalten
IVD	In-vitro-Diagnostika	PLATE	Platte
REF	Katalognummer	CONJ	Konjugieren
	Ausreichend für n Tests	CTRL +	Positivkontrolle
LOT	Chargencode	CTRL -	Negativkontrolle
	Verwendung durch	CAL	Kalibrierer
	Einschränkungen der Lagertemperatur	DIL SPE	Probenverdünnungsmittel
CONT	Inhalt	SOLN TMB	TMB
UDI	Eindeutige Geräteidentifikationsnummer	SOLN STOP	Stopplösung
	Beachten Sie die Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	WASH 10X	Waschpufferkonzentrat (10X)
	Elektronische Gebrauchsanweisung konsultieren	DE	Deutsch
	In aufrechter Position aufbewahren	Made in the USA	Hergestellt in den USA
RX Only	Gilt für die USA: Nur für verschreibungspflichtige Zwecke		Ätzend
	Gefahrenkommunikation	EC REP	Bevollmächtigter Vertreter der Europäischen Kommission
	Übereinstimmung mit der Richtlinie 98/79		



ZEUS Scientific

200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Option 2
International: +1 908-526-3744
Fax: +1 908-526-2058
Website: www.zeusscientific.com



EMERGO EUROPE

Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

Für Kundenservice in den USA wenden Sie sich bitte an Ihren lokalen Vertriebspartner. Für technischen Support in den USA kontaktieren Sie ZEUS Scientific telefonisch über die gebührenfreie Hotline oder per E-Mail an support@zeusscientific.com.

Für Kundenservice- und technische Supportanfragen außerhalb der USA wenden Sie sich bitte an Ihre lokale Sebia-Niederlassung oder Ihren autorisierten Vertriebspartner.

©2025 ZEUS Scientific. Alle Rechte vorbehalten.