

Arbeitsanleitung

EIA Borrelia recombinant IgM (192)

REF BrM192



Kit für den professionellen Einsatz



 **TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.**
Křížíkova 68, 612 00 Brno, Czech Republic
Tel.: +420 541 248 311
FAX: +420 541 243 390
E-mail: info@testlinecd.com
www.testlinecd.cz
www.testlinecd.com

INHALT

1	Verwendungszweck	3
2	Einleitung.....	3
3	Testprinzip	4
4	Bestandteile des Kits	5
5	Erforderliche, nicht im Kit enthaltene Geräte und Materialien, für die manuelle Durchführung.....	6
6	Lagerung und Haltbarkeit des Kits.....	6
7	Vorbereitung der Reagenzien	6
8	Probenverdünnung	7
9	Testdurchführung.....	7
10	Arbeitsschema	9
11	Testvalidität	10
12	Auswertung der Ergebnisse.....	10
13	Charakteristiken des Kits.....	13
14	Arbeitssicherheit.....	16
15	Technische Anmerkungen	16
16	Nachweis der intrathekalen Synthese spezifischer Antikörper	18
17	Referenzen.....	24
18	Symbolerklärung.....	25

1 Verwendungszweck

Enzym-Immunoassay zur Ermittlung von IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato in humanem Serum, Plasma, Liquor oder in der Synovialflüssigkeit und zum Nachweis von intrathekalen Synthese Borrelien-spezifischen Antikörpern.

2 Einleitung

Die Lyme-Borreliose (LB) ist eine multisystemische Infektionskrankheit, die durch Spirochäten des Bakteriums *Borrelia burgdorferi* ausgelöst wird. Die Übertragung erfolgt durch Zecken der Familie *Ixodes*.

Bei den klinischen Symptomen der Lyme-Borreliose wird zwischen Früh- und Spätsymptomen unterschieden.

- Lokalisierte Frühphase – dauert in der Größenordnung einiger Tage bis Wochen. Ein typisches Erscheinungsbild ist die Erythema migrans (EM), die nur in 50% der Fälle auftritt. Die Erkrankung äußert sich meist zuerst durch grippeähnliche Symptome, Kopfschmerzen und Lymphadenitis.
- Disseminierte Frühphase – dauert einige Wochen bis Monate. Dabei kommt es zur hämatogenen und lymphogenen Dissemination der Borrelienerreger (ZNS, Gelenke, Herz, Auge, Haut - sekundäre EM). In dieser Phase werden am häufigsten Neuroborreliose, Fazialis-Parese, Borrelien-Lymphozytom (entsteht an Ohrläppchen, Fingergelenken) und Bannwarth-Syndrom diagnostiziert.
- Disseminierte Spätphase – dauert Monate bis Jahre. Dabei kommt es zu immunopathologischen Veränderungen.

Diagnostisch typisch sind Acrodermatitis chronica atrophicans (chronisch-progressive Hauterkrankung - ACA), chronische Neuroborreliose, Borrelien-Arthritis.

Die Ergebnisse zahlreicher Studien zeigen, dass alle Genospecies nicht nur an der Entstehung von EM, sondern auch an einer ganzen Bandbreite klinischer Manifestationen beteiligt sind. Die Häufigkeit der Isolation deutet jedoch darauf hin, dass das Bakterium *B. burgdorferi* sensu stricto mit dem Gelenkbefall, das *B. garinii* mit den neurologischen Symptomen und das *B. afzelii* mit den chronischen Hautsymptomen, vor allem mit ACA assoziiert wird.

Die Diagnose der Erkrankung basiert auf dem klinischen Bild, der Anamnese und auf Laboruntersuchungen. Aktuell gilt als die beste Diagnosemethode die Screening-Bestimmung der spezifischen Antikörper der Klassen IgG und IgM mit Hilfe des ELISA-Verfahrens und die anschließende Bestätigung der Antikörper gegen spezifische Antigene mittels Immunoblot. Die direkte Kultivierung oder elektronenmikroskopischer Nachweis ist als Routinenachweis nicht geeignet.

Eine serologische Diagnostik der Borreliose ist wegen der verschiedenen Faktoren wie der großen genetischen Diversität der Art *Borrelia burgdorferi* s.l., der möglichen Kreuzreaktivität mit nichtverwandten Antigenen anderer Mikroorganismen oder des

hohen Gehalts an Heat-Shock-Proteinen in den Borrelien schwierig. Die Diagnostik wird außerdem durch die großen Unterschiede in der serologischen Reaktivität bei verschiedenen Individuen erschwert. Die Antikörperbildung kann in der Frühphase extrem langsam verlaufen. Andererseits können die IgG- und IgM-Antikörper zehn und mehr Jahre im Körper überdauern.

Der EIA *Borrelia* recombinant ist ein Enzym-Immuno-Assay Kit der III. Generation mit einer hohen diagnostischen Empfindlichkeit und Spezifität, geeignet für die Screening-Bestimmung von anti-Borrelien-Antikörpern, einschließlich des Nachweises der intrathekalen Synthese bei Patienten mit suspekter Neuroborreliose.

3 Testprinzip

Das Kit ermöglicht die Bestimmung spezifischer IgM-Antikörper in der Probe mittels der Sandwich-EIA-Methode (d.h. antigenbeschichtete feste Phase - Antikörper aus der untersuchten Probe - markierter Antikörper). Der markierte Antikörper (Konjugat) ist eine tierische Immunglobulinfraktion gegen menschliches IgM, die mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Die Peroxidaseaktivität wird durch das TMB-Substrat bestimmt, das sich bei einer positiven Reaktion blau färbt. Die Enzymreaktion wird mit einer Stopplösung beendet. Die blaue Färbung schlägt in eine gelbe um. Die Intensität der Gelbfärbung wird mit dem Photometer (bei einer Wellenlänge von 450 nm) gemessen und ist proportional zur Konzentration der spezifischen IgM-Antikörper in der Probe.

Verwendetes Antigen

Kombinationen rekombinanter Antigene OspC (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. spielmanii*), VlsE, des internen Flagellin - p41i, p39, p17 und OspE von *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

4 Bestandteile des Kits

MICROPLATE	Beschichtete Platte	2 Stck.
	mit gebundenem Antigen, 12 x 8 Vertiefungen im Beutel mit Trocknungsmittel	
CONTROL - CAL1	Negative Kontrolle (Kalibrator 1) 5 U/ml	1 x 2 ml
	Lösung ohne spezifische menschliche Antikörper, gebrauchsfertig	
CUTOFF CAL2	CUT-OFF (Kalibrator 2) 20 U/ml	1 x 3 ml
	Lösung mit grenzwertiger Konzentration spezifischer menschlicher Antikörper, gebrauchsfertig	
CONTROL + CAL3	Positive Kontrolle (Kalibrator 3) 200 U/ml	1 x 2 ml
	Lösung mit spezifischen menschlichen Antikörpern, gebrauchsfertig	
CONJUGATE	Konjugat	1 x 28 ml
	Lösung mit tierischem Immunglobulin gegen menschliches IgM, Peroxidase- Konjugiert, gebrauchsfertig	
DILUENT 2	Verdünnungslösung für die Proben 2	1 x 105 ml
	Puffer mit Eiweißstabilisatoren, gebrauchsfertig	
SUBSTRATE 2	TMB-Substrat 2	1 x 28 ml
	Einkomponenten-Substratlösung, TMB/H ₂ O ₂ , gebrauchsfertig	
WASH 20x	Waschlösung	2 x 75 ml
	20x konzentrierter Puffer	
STOP	Stopplösung	1 x 28 ml
	Säurelösung, gebrauchsfertig	
	Arbeitsanweisung	1 Stck.

5 Erforderliche, nicht im Kit enthaltene Geräte und Materialien, für die manuelle Durchführung

Ein- und Mehrkanalpipetten

Einmalspitzen

Wascher

Stoppuhr

Inkubator für 37°C

Photometer für Mikrotiterplatten

6 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Das Kit muss bei einer Temperatur von +2°C bis +8°C gelagert werden. Bei Einhaltung der Lagerungsbedingungen gilt das auf der Verpackung des Kits angegebene Haltbarkeitsdatum. Der angebrochene Kit sollte innerhalb von drei Monaten verbraucht werden. Das Kit darf nicht einfrieren!

Proben und ihre Lagerung

Als Probe kann menschliches Serum, Zitratplasma, Liquor und Synovialflüssigkeit verwendet werden. Mit Bakterien verseuchte Proben, hämolytische Proben oder Proben mit Chylus und im Plasma enthaltene Antikoagglutinationsmittel (Zitrat ausgenommen) können das Testergebnis beeinflussen.

Die Proben können bei einer Temperatur von +2°C bis +8°C höchstens 1 Woche lang aufbewahrt werden. Frieren Sie die Proben bei längerer Lagerung bei -20°C ein. Verdünnte Proben sind möglichst bald zu untersuchen.

7 Vorbereitung der Reagenzien

Verdünnen Sie die Waschlösung im Verhältnis 1:20 (1 Teil Lösung und 19 Teile destilliertes Wasser). Z.B. 75 ml konzentrierte Waschlösung + 1425 ml destilliertes Wasser.

In der Flasche mit der Waschlösung können sich Salzkristalle bilden. Diese Kristalle müssen vor Gebrauch durch Erwärmung im Wasserbad aufgelöst werden. Die verdünnte Lösung ist eine Woche lang bei +2°C bis +8°C haltbar.

Die Kontrollen (positive, negative und CUT-OFF) sind gebrauchsfertig, nicht weiter verdünnen!

Das Konjugat ist gebrauchsfertig, nicht weiter verdünnen!

Das TMB-Substrat ist eine chromogene Einkomponenten-Substratlösung und gebrauchsfertig, nicht weiter verdünnen!

Austauschbarkeit der Lösungen

Die Verdünnungslösung für die Proben, TMB-Substrat und Aviditätspuffer sind in den EIA-Kits von TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. austauschbar, wenn sie die gleiche numerische Kennzeichnung aufweisen (z.B. Verdünnungslösung für die Proben 2, Verdünnungslösung für die Proben 3, usw.). Die Stopp- und Waschlösung ist in allen Kits universell.

8 Probenverdünnung

Mischen Sie die Verdünnungslösung für die Proben vor der Verwendung schonend.

Verdünnung der Serum- und Plasmaproben

Verdünnen Sie die gründlich gemischten Proben 1:101 mit der Verdünnungslösung für die Proben:

z.B: 10 µl Probe + 1 ml Verdünnungslösung für die Proben.

Gut mischen.

Verdünnung der Liquorproben

Verdünnen Sie die gründlich gemischten Proben 1:2 mit der Verdünnungslösung für die Proben:

z.B: 110 µl Liquor + 110 µl Verdünnungslösung für die Proben.

Gut mischen.

Verdünnung der Synovialflüssigkeitsproben

Verdünnen Sie die gründlich gemischten Proben 1:21 und 1:41 mit der Verdünnungslösung für die Proben:

z.B: 20 µl Flüssigkeit + 400 µl Verdünnungslösung und
10 µl Flüssigkeit + 400 µl Verdünnungslösung.

Gut mischen.

9 Testdurchführung

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen und gründlich zu mischen. Sofern Sie nicht die gesamte Platte verwenden, so legen Sie die nicht benötigten Strips in die Verpackung mit dem Trocknungsmittel zurück, verschließen diese luftdicht und lagern sie bei +2°C bis +8°C. Sorgfältig vor Feuchtigkeit schützen!

1. Pipettieren Sie die Kontrollen (Kalibratoren) sowie die verdünnten Proben gemäß dem Arbeitsschema.

Semiquantitative Auswertung im Index der Positivität (IP)

- Lassen Sie die Vertiefung A1 leer (Blank).
- Pipettieren Sie 100 µl der Negativen Kontrolle (Kalibrator 1) in 1 Vertiefung.
- Pipettieren Sie 100 µl CUT-OFF (Kalibrator 2) in 2 Vertiefungen.
- Pipettieren Sie 100 µl der Positiven Kontrolle (Kalibrator 3) in 1 Vertiefung.
- Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Proben (siehe Probenverdünnung) in die restlichen Vertiefungen.

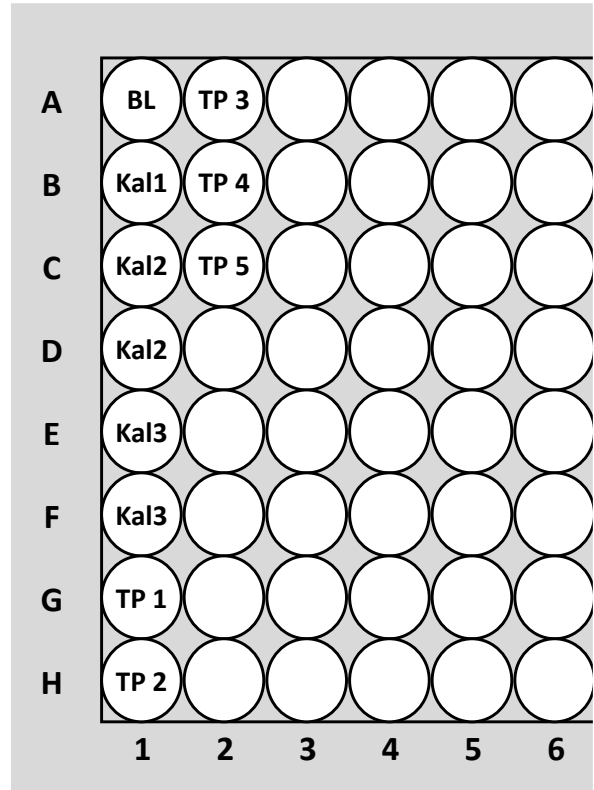
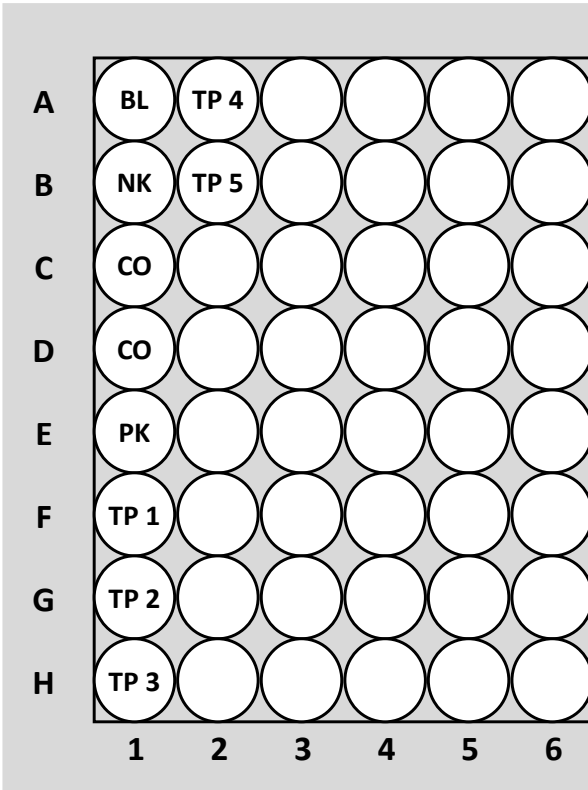
Quantitative Auswertung in Units U/ml

- Lassen Sie die Vertiefung A1 leer (Blank).
 - Pipettieren Sie 100 µl der Negativen Kontrolle (Kalibrator 1) in 1 Vertiefung.
 - Pipettieren Sie 100 µl CUT-OFF (Kalibrator 2) in 2 Vertiefungen.
 - Pipettieren Sie 100 µl der Positiven Kontrolle (Kalibrator 3) in 2 Vertiefungen.
 - Pipettieren Sie 100 µl der verdünnten Proben (siehe Probenverdünnung) in die restlichen Vertiefungen.
2. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
 3. Saugen Sie den Inhalt der Vertiefungen ab und waschen Sie 5× mit Arbeitswaschlösung. Füllen Sie die Vertiefungen bis zum oberen Rand. Verbleibende Flüssigkeit zum Schluss durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
 4. Pipettieren Sie 100 µl Konjugat in alle Vertiefungen mit Ausnahme von A1.
 5. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
 6. Saugen Sie den Inhalt der Vertiefungen ab und waschen Sie 5× mit Arbeitswaschlösung. Füllen Sie die Vertiefungen bis zum oberen Rand. Verbleibende Flüssigkeit zum Schluss durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
 7. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen 100 µl TMB-Substrat. Achten Sie auf Verschmutzungen – siehe Kapitel Technische Anmerkungen.
 8. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubieren.
 9. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und den gleichen Intervallen, wie das Substrat pipettiert wurde.
 10. Messen Sie am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm die Intensität der Verfärbung der Lösungen in den Vertiefungen im Vergleich zum Blank (Vertiefung A1), und zwar innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen der Reaktion.

10 Arbeitsschema

semiquantitative Auswertung
im Index der Positivität (IP)

quantitative Auswertung
in Units U/ml



BL	Blank (leere Vertiefung)		
NK	100 µl	CONTROL -	CAL1
CO	100 µl	CUTOFF	CAL2
PK	100 µl	CONTROL +	CAL3
TP 1-x	100 µl	verdünnte Testprobe	

BL	Blank (leere Vertiefung)		
Kal1	100 µl	CONTROL -	CAL1
Kal2	100 µl	CUTOFF	CAL2
Kal3	100 µl	CONTROL +	CAL3
TP 1-x	100 µl	verdünnte Testprobe	

11 Testvalidität

Der Test ist gültig, wenn:

Die Blank-Extinktion ist kleiner als 0,150.

$$\text{BLANK} < 0,150$$

Die Extinktion der Negativen Kontrolle (Kalibrator 1) ist kleiner als die Hälfte des Durchschnitts der Extinktion von CUT-OFF (Kalibrator 2).

$$\boxed{\text{CONTROL}} \mid \boxed{-} \mid \boxed{\text{CAL1}} < 0,5 \times \boxed{\text{CUTOFF}} \mid \boxed{\text{CAL2}}$$

Die durchschnittliche Extinktion von CUT-OFF (Kalibrator 2) liegt im Bereich von 0,150 – 0,900.

$$0,150 < \boxed{\text{CUTOFF}} \mid \boxed{\text{CAL2}} < 0,900$$

Die Extinktion der Positiven Kontrolle (Kalibrator 3) ist größer als das 1,5-fache der durchschnittlichen Extinktion von CUT-OFF (Kalibrator 2).

$$\boxed{\text{CONTROL}} \mid \boxed{+} \mid \boxed{\text{CAL3}} > 1,5 \times \boxed{\text{CUTOFF}} \mid \boxed{\text{CAL2}}$$

12 Auswertung der Ergebnisse

Berechnung des Positivitätsindex (IP)

Dividieren Sie die Extinktion der getesteten Probe durch die durchschnittliche in der gleichen Serie der Untersuchung gemessene Extinktion von CUT-OFF:

$$\text{IP} = \frac{\text{Extinktion Serum, Plasma, Liquor, Synovialflüssigkeit}}{\text{Durchschnittliche Extinktion CUT OFF}}$$

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse siehe Tabellen (Tabelle 1 und Tabelle 2).

Tabelle 1 Interpretation der Untersuchungsergebnisse für Serum, Plasma und Liquor

Positivitätsindex (IP)	Auswertung
kleiner als 0,9	negativ
0,9 bis 1,1	grenzwertig
höher als 1,1	positiv

Die Untersuchung grenzwertiger Proben, d. h. Proben mit einem Positivitätsindex von 0,9 bis 1,1, muss nach 2 bis 6 Wochen unter Berücksichtigung der jeweiligen spezifischen Erkrankung nach erneuter Entnahme wiederholt werden.

Tabelle 2 Interpretation der Untersuchungsergebnisse für die Synovialflüssigkeit

Probe	Verdünnung der Probe	Verdünnung der Probe	Auswertung
	1:21	1:41	
	IP	IP	
Probe X	kleiner als 1,0	kleiner als 1,0	negativ
Probe Y	höher als 1,0	kleiner als 1,0	grenzwertig
Probe Z	höher als 1,0	höher als 1,0	positiv

Die Interpretation der Untersuchungen basiert auf dem Vergleich der bei zwei verschiedenen Probenverdünnungen erreichten IP.

Quantitative Auswertung in internationalen Einheiten (U/ml)

Erstellen Sie eine Kalibrierungskurve, indem Sie die Konzentration der Kalibratoren in U/ml (X-Achse) gegen die entsprechenden Extinktionen (Y-Achse) auftragen. Durch Verbindung der einzelnen Punkte erstellen Sie die Kalibrierungskurve. Bestimmen Sie den Antikörperspiegel in den Proben (U/ml) durch Ablesen dieser Werte von der Kalibrierungskurve. Die Interpretationen der Ergebnisse der quantitativen Auswertung des Tests siehe Tabelle (Tabelle 3).

Tabelle 3 Quantitative Interpretation der Untersuchungsergebnisse für Serum, Plasma und Liquor in internationalen Einheiten (U/ml)

Antikörperspiegel (U/ml)	Auswertung
kleiner als 18	negativ
18 bis 22	grenzwertig
höher als 22	positiv

Die Untersuchung grenzwertiger Proben muss nach 2 bis 6 Wochen unter Berücksichtigung der jeweiligen spezifischen Erkrankung nach erneuter Blutentnahme wiederholt werden.

Der serologische Befund kann nur im Kontext mit den Ergebnissen anderer Labortests und mit dem klinischen Bild des Patienten interpretiert werden.

Bestimmung der intrathekalen Synthese mittels des Antikörperindex

Die Bestimmung des Antikörperindex ist beschrieben im Kapitel 14 Nachweis der intrathekalen Synthese spezifischer Antikörper.

13 Charakteristiken des Kits

13.1 Spezifität und Sensitivität

Die diagnostische Spezifität wurde auf der Platte negativer Seren ermittelt. Die diagnostische Sensitivität wurde auf der Platte positiver Seren ermittelt. Die Anzahl der getesteten Seren und die gewonnenen Ergebnisse sind in der Tabelle (Tabelle 4) beschrieben.

13.2 Wiederholbarkeit

Die Referenz-Kontrollproben wurden in statistisch relevanter Anzahl der Replikationen, und zwar in einer oder in mehreren Analysen, getestet. Die gewonnenen Daten wurden für die Bestimmung der Intra Assay und der Präzision im Rahmen des Labors verwendet. Die erlangten Ergebnisse sind in der Tabelle (Tabelle 4) beschrieben.

13.3 Analytische Sensitivität – Schwellenwert der Sensitivität

Es handelt sich um die Verdünnung einer grenzwertigen oder schwach positiven Probe, ggf. laut international anerkannten Standards, bei welcher sich die Absorbanz (Extinktion) noch ändert. Sie wird in den Einheiten U/ml ausgedrückt. Dieser Wert ist eine minimale Nachweis- und Quantifizierungsgrenze. Die erlangten Ergebnisse sind in der Tabelle (Tabelle 4) beschrieben.

13.4 Intra-Homogenität

Sie bringt den Grad der Übereinstimmung der Ergebnisse unter 100 Replikationen einer grenzwertigen oder schwach positiven Probe in einer Untersuchungsserie zum Ausdruck. Ausgedrückt wird sie mithilfe des Variationskoeffizienten. Die erlangten Ergebnisse sind in der Tabelle (Tabelle 4) beschrieben.

13.5 Messbereich des Kits

Der Messbereich eines jeden Kits liegt zwischen den Werten des niedrigsten und des höchsten Kalibrators.

Tabelle 4 Charakteristiken des Kits

Parameter	Wert
Spezifität (n 124)	97,72 %
Sensitivität (n 114)	99,07 %
Intra-assay	33,43 %
WL Präzision	6,42 %
Analytische Empfindlichkeit – Positivitätsindex (IP)	0,07
Homogenität	3,64 %

13.6 Interferenz

Zwei Proben (ein Mix negativer Plasmen und ein Mix positiver Plasmen) wurden mit potentiell interferierenden endogenen Stoffen angereichert. Die Ergebnisse der Interferenz zeigt die Tabelle (Tabelle 5).

Tabelle 5 Ergebnisse der Interferenz

Interferierender Stoff	Ergebnis unbeeinflusst bis zur Konzentration:
Bilirubin	0,4 mg/ml
Triacylglycerole	20 mg/ml
Hämoglobin	5 mg/ml

13.7 Kreuzreaktivität

Mittels des Kits wurden positive Proben für ausgewählte potentiell kreuzreagierende Pathogene oder Faktoren untersucht. Die Ergebnisse des Tests umfasst die Tabelle (Tabelle 6).

Tabelle 6 Ergebnisse der kreuzreagierenden Pathogene oder Faktoren

Kategorien	n	Positives Ergebnis
Treponema pallidum	15	0
Chlamydia pneumoniae	8	0
Mycoplasma pneumoniae	13	0
TBEV	8	0
RF	13	0
ANA	19	0
EBV	9	0
Total	85	0

14 Arbeitssicherheit

Der Test ist nur für Diagnosezwecke in vitro vorgesehen.

Die bei der Fertigung der Kontrollen verwendeten Seren wurden mit negativem Ergebnis auf HIV 1 und HIV 2, HBsAg, HCV, TPHA untersucht. Dennoch ist es erforderlich, mit den Seren so umzugehen, als seien sie potentiell Infektionsmaterial.

Einige Reagenzien enthalten das giftige Natriumazid. Vermeiden Sie Hautkontakt.

Die Stopplösung enthält eine verdünnte Säurelösung.

Schützen Sie bei der Arbeit mit dieser Lösung Ihre Augen und Ihre Haut!

Es ist notwendig, die örtlichen Arbeitssicherheitsbestimmungen einzuhalten.

Erste-Hilfe-Maßnahmen

Spülen Sie bei Augenkontakt Ihre Augen gründlich mit lauwarmem Wasser und suchen Sie einen Arzt auf. Entledigen Sie sich bei Kleidungs- und Hautkontakt sämtlicher kontaminierter Kleidung. Spülen Sie die Haut gründlich mit Wasser und Seife ab. Desinfizieren Sie die Haut, sofern Spritzer einer Lösung, die Plasma oder eine klinische Probe enthält, auf diese gelangen. Spülen Sie bei zufälligem Verzehr Ihren Mund mit Trinkwasser aus und nehmen Sie ärztliche Hilfe in Anspruch.

Resteentsorgung

Sämtliche zur Testdurchführung verwendeten Hilfsmittel sind hinsichtlich des Kontakts mit biologischem Material als potentiell infektiös zu betrachten. Deshalb sind sie als biologischer Abfall zu entsorgen.

Entsorgung des Kits nach Ablauf der Haltbarkeitsdauer

Zerlegen Sie das Kit in seine einzelnen Komponenten und entsorgen Sie diese als biologisches Material. Entsorgen Sie die Verpackungen und Verpackungsreste gemäß den örtlichen Vorschriften als sortierten Abfall.

15 Technische Anmerkungen

Um zuverlässige Ergebnisse zu erzielen, ist die **genaue Einhaltung der Anleitung** notwendig. Verwenden Sie bei der Arbeit stets Hilfsmittel höchsten Sauberkeitsgrades. Bevorzugen Sie Hilfsmittel für den einmaligen Gebrauch.

Mikrotiterplatte – Bringen Sie vor dem Öffnen den Beutel mit der Mikrotiterplatte auf Labortemperatur, damit auf der Plattenoberfläche kein Wasserdampf kondensiert.

Waschlösung – verwenden Sie zur Vorbereitung der Waschlösungs-Arbeitsverdünnung hochwertiges destilliertes Wasser.

Waschen – halten Sie die vorgeschriebene Anzahl der Waschzyklen ein und füllen Sie die Vertiefungen bis zum oberen Rand. Die Zeitdauer, während der die Vertiefungen zwischen den Waschzyklen mit der Waschlösung gefüllt verbleiben (soak time), sollte etwa 30 – 60 Sekunden betragen.

TMB-Substrat – verwenden Sie die Pipettierwanne für TMB-Substrat für keine anderen Lösungen. Füllen Sie den Lösungsrest aus der Pipettierwanne nicht in die Flasche zurück.

Nicht nachvollziehbaren Ergebnissen können methodische Fehler zugrunde liegen, insbesondere:

- unzureichendes Mischen der Lösungen und der Proben vor der Verwendung
- Vertauschen der Flaschenverschlüsse
- Verwendung der gleichen Spitze zum Pipettieren verschiedener Lösungen
- die Reagenzien wurden zu hohen Temperaturen, bakterieller oder chemischer Kontamination ausgesetzt
- unzureichendes Auswaschen der Vertiefungen, die Vertiefungen wurden nicht bis zum Rand gefüllt, schlechtes Absaugen der Lösungsreste
- Verschmutzung der Vertiefungsränder mit Konjugat oder mit Proben
- Vertauschen der Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen
- Kontakt der Reagenzien mit Oxidationsmitteln, Schwermetallen und deren Salzen.

Das Kit kann in mehrere Tests aufgeteilt werden. Entnehmen Sie zur Vorbereitung der Arbeitslösungen nur so große Mengen Reagenzien, wie für die Analyse notwendig sind.

Der Test kann auf allen Typen automatischer ELISA-Analysatoren durchgeführt werden. Bei Bedarf bietet TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. eine zertifizierte Modifizierung der Arbeitsanweisung für den jeweiligen Automatentyp an.

Das Produkt ist durch das Europäische Patent Nummer 0894143 und Nummer 1012181 geschützt.

Bei Nichteinhaltung des Arbeitsverfahrens haftet der Hersteller nicht für die korrekte Funktion des Tests.

16 Nachweis der intrathekalen Synthese spezifischer Antikörper

16.1 Einleitung

Der Nachweis der intrathekalen Antikörperproduktion ist nach der internationalen Empfehlung (EFNS Richtlinie) unerlässlich für die Diagnostik der frühen und späten Neuroborreliose. Der Nachweis erhöhter Antikörper im Serum allein ist nicht ausreichend. Die Diagnostik der Neuroborreliose besteht in der Detektion der im Liquor produzierten spezifischen anti-Borrelien-Antikörper. Dies erfolgt durch die Bestimmung des spezifischen Antikörperindex – Antibody-Index (AI). Die Hauptaufgabe des Antikörperindex besteht in der Bestätigung der intrathekalen Synthese spezifischer Antikörper im Liquor.

16.2 Testprinzip

Der Antikörperindex repräsentiert das Verhältnis der Antikörperkonzentration im Liquor und im Blutserum bezogen auf den Zustand der Blut-Liquor-Schranke und die Konzentration von Gesamt-Immunglobulinen im Liquor und im Serum.

Der Antibody-Index-Standard dient zur Erstellung der Kalibrierkurve, aus der mittels des Programms Antibody Index Software von der Firma TestLine Clinical Diagnostics s.r.o. die entsprechenden arbiträren Einheiten der getesteten Probe bestimmt werden und anschließend der Antikörperindex berechnet wird.

16.3 Material für die Testdurchführung

Um den Antikörperindex zu bestimmen, müssen sowohl CSF – als auch Serum- (Plasma-) Proben gleichzeitig entnommen werden.

16.4 Unterlagen und Ausrüstung zur Auswertung des Antikörperindex

Zur Testauswertung benötigen Sie Folgendes:

1. Die Konzentrationswerte von Albumin und Gesamt-Immunglobulinen IgM im Liquor und Serum. Die Bestimmung erfolgt z. B. nephelometrisch. Das Verhältnis der Albumin-Konzentrationen im Liquor und im Serum entspricht dem Zustand der Blut-Liquor-Schranke.
2. Das Programm Antibody Index Software

16.5 Verdünnung der Liquor- und Serumproben

Verfahren Sie in gleicher Weise wie bei der Bestimmung der spezifischen Antikörper (siehe Kapitel Verdünnung der Proben).

Weitere Verdünnung der Liquor- und Serumproben

Erfolgt nur dann, wenn die Extinktionen von Liquor oder Liquor und Serum die Extinktion vom höchsten Punkt der Kalibrierkurve übersteigen und das AI-Ergebnis bei einer solchen Paarprobe negativ ausfällt.

Verdünnte Liquor- und Serumproben (siehe. Verdünnung von Proben) 1:10 mit der Verdünnungslösung für die Proben weiter verdünnen:

z.B: 15 µl verdünnte Serumprobe + 135 µl Verdünnungslösung und
15 µl verdünnte Liquorprobe + 135 µl Verdünnungslösung.

Gut mischen.

16.6 Testdurchführung

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur zu bringen und gründlich zu mischen. Sofern Sie nicht die gesamte Platte verwenden, legen Sie die nicht benötigten Strips in die Verpackung mit dem Trocknungsmittel zurück, verschließen diese luftdicht und lagern sie bei +2°C bis +8 °C. Sorgfältig vor Feuchtigkeit schützen!

Die Leistung des Antikörper-Index-Assays ist identisch mit der herkömmlicher Proben tests.

1. Dispensieren Sie Kontrollen (Kalibratoren) und verdünnte Proben gemäß Arbeitsplan.

Semiquantitative Bewertung im Positivitätsindex (IP):

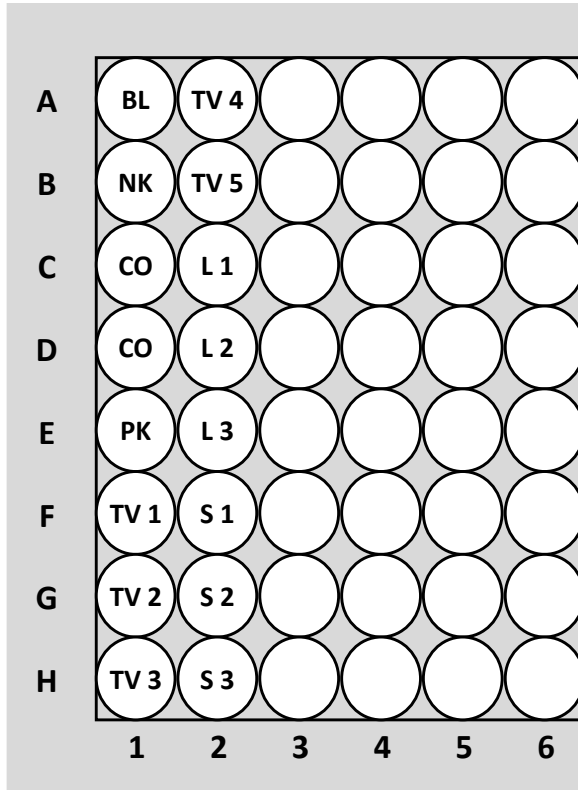
- Lassen Sie die Vertiefung A1 leer (Blank).
- Pipettieren Sie 100 µl Negativkontrolle (Kalibrator 1) in 1 Vertiefung.
- Pipettieren Sie 100 µl CUT-OFF (Kalibrator 2) in 2 Vertiefungen.
- Pipettieren Sie 100 µl Positivkontrolle (Kalibrator 3) in 1 Vertiefung.
- Pipettieren Sie 100 µl Proben mit den entsprechenden Verdünnungen in die verbleibenden Vertiefungen.
- Pipettieren Sie 100 µl der Proben (Liquor, Serum) in entsprechender Verdünnung in die restlichen Vertiefungen.

Quantitative Auswertung in U/ml

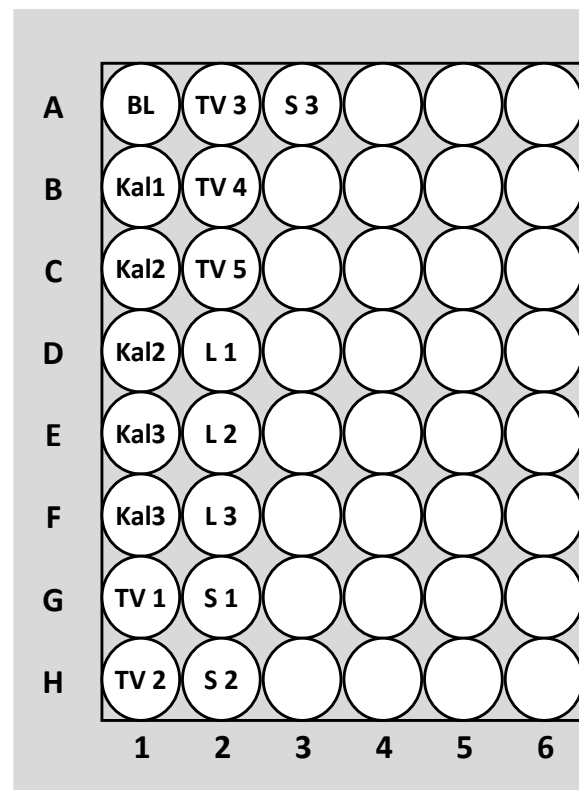
- Lassen Sie die Vertiefung A1 leer (Blank).
 - Pipettieren Sie 100 µl Negativkontrolle (Kalibrator 1) in 1 Vertiefung.
 - Pipettieren Sie 100 µl CUT-OFF (Kalibrator 2) in 2 Vertiefungen.
 - Pipettieren Sie 100 µl Positivkontrolle (Kalibrator 3) in 2 Vertiefungen.
 - Pipettieren Sie 100 µl Proben mit den entsprechenden Verdünnungen in die verbleibenden Vertiefungen.
 - Pipettieren Sie 100 µl der Proben (Liquor, Serum) in entsprechender Verdünnung in die restlichen Vertiefungen.
2. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
 3. Saugen Sie den Inhalt der Vertiefungen ab und waschen Sie 5× mit Arbeitswaschlösung. Füllen Sie die Vertiefungen bis zum oberen Rand. Verbleibende Flüssigkeit zum Schluss durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
 4. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen mit Ausnahme von A1 100 µl Konjugat.
 5. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 30 Minuten bei 37°C inkubieren.
 6. Saugen Sie den Inhalt der Vertiefungen ab und waschen Sie 5× mit Arbeitswaschlösung. Füllen Sie die Vertiefungen bis zum oberen Rand. Verbleibende Flüssigkeit zum Schluss durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
 7. Pipettieren Sie in alle Vertiefungen 100 µl TMB-Substrat. Achten Sie auf Verschmutzungen – siehe Kapitel Technische Anmerkungen.
 8. Decken Sie die Platte mit dem Deckel ab und lassen Sie sie 15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubieren.
 9. Stoppen Sie die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und den gleichen Intervallen, wie das Substrat pipettiert wurde.
 10. Messen Sie am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm die Intensität der Verfärbung der Lösungen in den Vertiefungen im Vergleich zum Blank (Vertiefung A1), und zwar innerhalb von 30 Minuten nach dem Stoppen der Reaktion.

16.7 Arbeitsschema

semiquantitative Auswertung
im Index der Positivität (IP)



quantitative Auswertung
in U/ml



BL	Blank (leere Vertiefung)			
NK	100 µl	CONTROL	-	CAL1
CO	100 µl	CUTOFF	CAL2	
PK	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	verdünnten Testprobe		
L 1-x	100 µl	verdünnte Liquorprobe		
S 1-x	100 µl	verdünnte Serumprobe		

BL	Blank (leere Vertiefung)			
Kal1	100 µl	CONTROL	-	CAL1
Kal2	100 µl	CUTOFF	CAL2	
Kal3	100 µl	CONTROL	+	CAL3
TV 1-x	100 µl	verdünnten Testprobe		
L 1-x	100 µl	verdünnte Liquorprobe		
S 1-x	100 µl	verdünnte Serumprobe		

16.8 Testvalidität

Der Test ist gültig, wenn:

Die Blank-Extinktion ist kleiner als 0,150.

$$\text{BLANK} < 0,150$$

Die durchschnittliche Extinktion von CUT-OFF (Kalibrator 2) liegt im Bereich von 0,350 - 0,750.

$$0,350 < \boxed{\text{CUTOFF}} \mid \boxed{\text{CAL2}} < 0,750$$

16.9 Auswertung der Ergebnisse

Bestimmung des Antikörperindex (AI)

Zur Bestimmung der intrathekalen Synthese verwenden Sie das Programm Antibody Index Software von der Firma TestLine, spol. s r.o. und gehen entsprechend der Programmanleitung vor.

Die Interpretation der Untersuchungsergebnisse siehe Tabelle (Tabelle 7).

Tabelle 7 Interpretation der Untersuchungsergebnisse

AI-Wert	Interpretation der Ergebnisse
< 1,4	negativer AI, intrathekale Synthese nicht nachgewiesen
1,4 - 1,5	grenzwertiger AI, das Ergebnis ist in Korrelation mit dem anhaltenden klinischen Befund und der Antikörperreaktion im Serum zu werten
> 1,5	positiver AI, intrathekale Synthese nachgewiesen

In Ausnahmefällen kann es vorkommen, dass die Extinktionen von Liquor oder von Liquor und Serum die Extinktion vom höchsten Punkt der Kalibrierkurve übersteigen und das AI-Ergebnis bei einem solchen Paarprobe negativ ausfällt. Das Programm weist Sie in der Bewertung auf diese Tatsache hin. Danach verdünnen Sie die verdünnten Liquor- und Serumproben weiter mit der Verdünnungslösung (siehe weitere Verdünnung der Liquor- und Serumproben) und wiederholen den Test.

Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse

Aufgrund der immunologischen Reaktivität des Organismus auf *Borrelia*-Antigene ist folgendes zu beachten:

- die langsame Antikörperbildung in der Frühphase der Erkrankung
- die Möglichkeit der Beeinflussung der Antikörperbildung durch vorherige Antibiotikagabe
- untypische Dynamik der Antikörperantwort
- die Persistenz der Antikörper nach der Behandlung muss nicht unbedingt ein Therapieversagen bedeuten
- die Seronegativität bei einer kleinen Prozentzahl der Betroffenen
- ein Negativbefund im Liquor schließt die Lyme-Neuroborreliose nicht aus.

Der Antikörperspiegel im Liquor hängt von folgenden Parametern ab:

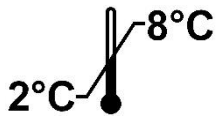
- Antikörperspiegel im Blutserum
- Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke
- intrathekale Antikörperproduktion.

Die spezifischen Immunoglobuline können intrathekal auch noch einige Jahre nach der Antibiotikabehandlung produziert werden. In manchen Fällen können die spezifischen Antikörper im Liquor früher als im Serum festgestellt werden.

17 Referenzen

1. Embers ME, Hasenkampf NR, Bames MB, Didier ES, Philipp MT, Tardo AC, Five-antigen fluorescent bead-based assay for diagnosis of Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol.* 2016, 23(4), 294-303.
2. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC, Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2001, 33(6), 780-785.
3. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC, Cross-Reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis.* 1987, 156(1), 183-188.
4. Marques AR, Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am.* 2015, 29(2), 295-307.
5. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, Fingerle V, Huppertz HI, Hunfeld KP, Krause A, Ruf B, Dersch R, Consensus group, Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci.* 2020, 18, 1-29.
6. Reiber H, Lange P, Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem.* 1991, 37(7), 1153-1160.
7. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J, Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17(1), 69-79.
8. Steere AC, Lyme disease. *N. Engl J Med.* 2001, 345, 115-125.
9. Trevejo RT, Krause PJ, Sikand VK, Schriefer ME, Ryan R, Lepore T, Porter W, Dennis DT, Evaluation of two-test serodiagnostic method for early Lyme disease in clinical practice. *J Infect Dis.* 1999, 179(4), 931-938.
10. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J, Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis.* 1993, 17(4), 708-717.
11. Wilske B., Zöller L., Brade V., Eiffert H., Göbel U.B., Stanek G. in cooperation with Pfister H.-W.; MiQ 12 2000 Lyme Borreliosis, *Microbiological diagnosis*
12. Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ, Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell.* 1997, 89(2), 275-285.

18 Symbolerklärung



Lagerungstemperatur



Trocken lagern



Mindesthaltbarkeitsdatum



Chargennummer



Hersteller



Gebrauchsanleitung beachten



Katalognummer



Testanzahl














In-Vitro-Diagnostikum

Notizen

Notizen

Testschema EIA Borrelia recombinant IgM (192)

Step	Symbol	Einzelne Testschritte
1		Verdünnung der Proben von Serum/Plasma 1:101 (10 µl + 1 ml) von Liquor 1:2 (110 µl + 110 µl) von Synovialflüssigkeit 1:21 (20 µl + 400 µl), 1:41 (10 µl + 400 µl)
2		Pipettieren der Kontrollen und der verdünnten Proben 100 µl Blank = leere Vertiefung
3		Inkubation 30 Min. bei 37°C
4		Absaugen und Waschen der Vertiefungen 5x
5		Pipettieren des Konjugats 100 µl Blank = leere Vertiefung
6		Inkubation 30 Min. bei 37°C
7		Absaugen und Waschen der Vertiefungen 5x
8		Pipettieren des Substrats (TMB-Substrat) 100 µl Einschließlich Blank
9		Inkubation 15 Min. bei 37°C
10		Pipettieren der Stopplösung 100 µl Einschließlich Blank
11		Photometrische Messung bei 450 nm