

**VIROTECH Borrelia Vet. Hund/Dog-Pferd/Horse IgG ELISA
(Borrelia Vet. Hund/Dog-Pferd/Horse IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: DC122.00

Farbcodierung: gold

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK BEI TIEREN

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**

Inhalt

| | |
|--|----------|
| 1. Verwendungszweck | 3 |
| 2. Diagnostische Bedeutung | 3 |
| 3. Testprinzip | 3 |
| 4. Packungsinhalt | 3 |
| 5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien | 4 |
| 6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise | 4 |
| 7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) | 4 |
| 8. Testdurchführung | 5 |
| 8.1 Untersuchungsmaterial | 5 |
| 8.2 Vorbereitung der Reagenzien | 5 |
| 8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung..... | 5 |
| 8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren | 6 |
| 9. Testauswertung | 6 |
| 9.1 Auswertungsschema IgG | 6 |
| 9.2 Grenzen des Tests..... | 7 |
| 10. Leistungsdaten | 7 |
| 10.1 Sensitivität und Spezifität | 7 |
| 10.2 Kreuzreaktivität | 8 |
| 11. Literatur | 8 |
| 12. Testablaufschemata | 9 |

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH Borrelia burgdorferi (Spezies B. burgdorferi sensu stricto) Veterinär ELISA ist ein indirekter ELISA zum semi-quantitativen und qualitativen Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern in Hunde- oder Pferdeseren.

2. Diagnostische Bedeutung

Allgemeines

Der Erreger der Borreliose, die Spirochaete Borrelia burgdorferi wurde 1981 von Burgdorfer und Barbour entdeckt und als Spezies der Gattung Borrelia klassifiziert (1).

Inzwischen wurden 3 Spezies von Borrelia burgdorferi sensu lato identifiziert: Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii und Borrelia afzelii (2).

Epidemiologie:

Die Borreliose kommt weltweit endemisch in allen gemäßigten Klimazonen vor (3). Es gibt allerdings Unterschiede in der relativen Häufigkeit der 3 Erreger-Spezies in den verschiedenen Regionen. So wurde in Nordamerika bisher nur B. burgdorferi sensu stricto beobachtet, in Europa dagegen wurden alle drei Spezies gefunden (2).

Übertragung:

B. burgdorferi wird vorwiegend von Schildzecken der Gattung Ixodes während des Stech- und Saugaktes übertragen.

Ixodes scapularis ist der in den USA bekannte Zeckenvektor, in Europa wurde Ixodes ricinus als Hauptvektor identifiziert (4).

Krankheitsbild beim Hund:

Es kann mit großer Übereinstimmung festgestellt werden, daß ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Anorexie und Fieber sowie die geradezu pathognomonischen Symptome einer wechselnden Lahmheit und Arthritis die stärksten Hinweise auf das Vorliegen einer Lyme-Borreliose beim Hund geben. Neben diesen Symptomen wurden in ca. 5% der Fälle Lymphadenopathien und in ca. 2% der Erkrankungen z.T. schwere Nierenfunktionsstörungen beobachtet (5).

Krankheitsbild beim Pferd:

Beim Aufenthalt auf der Weide werden Pferde häufig von Zecken befallen. In West- und Mitteleuropa handelt es sich dabei nahezu ausschließlich um die Zeckenart Ixodes ricinus, die als Adulte, Nymphe und Larve an Pferden saugt (5).

In Deutschland (Hannover) konnten die Krankheitssymptome von 50 Pferden ermittelt werden. Auffällig war der hohe Anteil an Augenerkrankungen (Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis, Retinitis), der mit den aus den USA gemachten Beobachtungen übereinstimmt. Die allgemeinen, wenig spezifischen Krankheitssymptome, wie Abmagerung und Leistungsabfall (24%) sowie Gelenkentzündungen (12%) und Lahmheit (10%) waren daneben die häufigsten Symptome, die zur Vorstellung der Patienten führten. Mehrfach wurden Polyarthritiden gesehen, die an nahezu allen Gelenken der Extremitäten auftreten konnten (6).

3. Testprinzip

Der im Tierserum gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

4. Packungsinhalt

1. **1 Mikrotiterplatte [MTP]**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig)** 2x50ml, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert) 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG negative Kontrolle Hund [NEG IgG Hund], 1300µl**, Hundeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle Hund [CO IgG Hund], 1300µl**, Hundeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig

6. **IgG positive Kontrolle Hund [POS IgG Hund], 1300µl**, Hundeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **Anti-Hund-IgG-Konjugat, 11ml**, Kaninchen-Myeloperoxidase-Konjugat, enthält Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
8. **IgG negative Kontrolle Pferd [NEG IgG Pferd], 1300µl**, Pferdeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
9. **IgG cut-off Kontrolle Pferd [CO IgG Pferd], 1300µl**, Pferdeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
10. **IgG positive Kontrolle Pferd [POS IgG Pferd], 1300µl**, Pferdeserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
11. **Anti-Pferd-IgG-Konjugat, 11ml**, Ziege-Myeloperoxidase-Konjugat, enthält Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
12. **Tetramethylbenzidin Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gebrauchsfertig
13. **Citrat-Stopplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

| Material | Zustand | Lagerung | Haltbarkeit |
|---------------------|-------------------------------|--|-------------|
| Untersuchungsproben | verdünnt | +2 bis +8°C | max. 6h |
| | unverdünnt | +2 bis +8°C | 1Woche |
| Kontrollen | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| MTP | nach Öffnen | +2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel) | 3Monate |
| Konjugat | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| TMB | nach Öffnen | +2 bis +8°C (lichtgeschützt) | 3Monate |
| Stopplösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| Waschlösung | nach Öffnen | +2 bis +8°C | 3Monate |
| | endverdünnt (gebrauchsfertig) | +2 bis +25°C | 4Wochen |

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Alle verdünnten Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen sollten als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopplösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Aqua dest./demin.
2. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
3. Mikropipetten, 10µl, 100µl, 1000µl
4. Reagenzgläser
5. Zellstofftücher
6. Abdeckung für ELISA-Platten
7. Abfallbehälter für infektiöses Material

8. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
9. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
10. Brutschrank

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial werden Seren eingesetzt.

Proben-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameter- und speziesspezifisch und ausschließlich mit der Plattencharge im Kit zu verwenden.

Die gebrauchsfertigen Konjugate sind ebenfalls parameter- und speziesspezifisch, können aber Plattenchargenübergreifend verwendet werden.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

1. Pro Testansatz jeweils 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen, cut-off und der positiven IgG-Kontrolle sowie der verdünnten Tierseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz nebeneinander (Leerwert, Kontrollen und Serumproben); bei der cut off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Tierseren: 1:400; z.B. Vorverdünnung: 10µl Serum + 90µl Verdünnungspuffer mischen (1:10); Weiterverdünnung: von diesem Gemisch 10µl entnehmen und 390µl Verdünnungspuffer dazu pipettieren (1:40). Dies entspricht einer 1:400 Verdünnung.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen, tierspezifischen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation des Konjugats: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4 maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und in jeder Kavität eine einheitliche Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen als Quantifizierungskontrollen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten = VE angegeben werden kann. Die Methode ist geeignet, Schwankungen bei der Testdurchführung auszugleichen und ermöglicht auf diese Weise eine hohe Reproduzierbarkeit. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

1. Testfunktionskontrolle:

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte <0,15 sein.

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

2. Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Von den OD-Werten einer Doppelbestimmung ist der Mittelwert zu bilden. Die Extinktion des Leerwertes (**450/620nm**) muß von allen Extinktionen abgezogen werden.

$$VE_{\text{(positive Kontrolle)}} = \frac{OD_{\text{(positive Kontrolle)}}}{OD_{\text{(cut-off Kontrolle)}}} \times 10$$
$$VE_{\text{(Tiereserum)}} = \frac{OD_{\text{(Tiereserum)}}}{OD_{\text{(cut-off Kontrolle)}}} \times 10$$

9.1 Auswertungsschema IgG

| Ergebnis (VE) | Beurteilung |
|---------------|-------------|
| < 8,0 | negativ |
| 8,0 - 12,0 | Graubereich |
| > 12,0 | positiv |

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb von 12 VE, so wird die Probe als positiv betrachtet.
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen Graubereiches, liegt keine signifikant hohe Antikörperkonzentration vor; die Proben werden als grenzwertig betrachtet.

Für den sicheren Nachweis einer Infektion ist es erforderlich, den Antikörpergehalt zweier Serumproben zu bestimmen:

eine Serumprobe sollte direkt nach Beginn der Infektion, eine zweite Probe zwei Wochen später getestet werden. Die Antikörperkonzentration beider Proben muß parallel, d.h. in einem Testansatz bestimmt werden. Eine korrekte Diagnose aufgrund der Bewertung einer einzelnen Serumprobe ist nicht möglich.

3. Liegen die gemessenen Werte unterhalb des definierten Graubereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen IgG-Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.2 Grenzen des Tests

Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.

10. Leistungsdaten

10.1 Sensitivität und Spezifität

IgG-Nachweis beim Hund

Um die Leistungsfähigkeit des Borrelia burgdorferi Veterinär ELISAs zu ermitteln, wurden 351 Seren auf dem VIROTECH Diagnostics ELISA und auf Referenztests (ELISA und Westernblot) getestet. Die Austestungen wurden in den Labors der VIROTECH Diagnostics GmbH, Rüsselsheim und in den Labors der Universität Maastricht durchgeführt.

35 Seren wurden gemeinsam positiv getestet, 278 Seren wurden negativ getestet, 6 Seren wurden gemeinsam grenzwertig getestet. 6 Seren stimmten nicht überein. Grenzwertige Ergebnisse (32) gingen nicht in die Berechnung ein.

Das Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle dargestellt:

| | | Referenztest | |
|----------|---|--------------|-----|
| | | + | - |
| VIROTECH | + | 35 | 6 |
| | - | 0 | 278 |

Spezifität = 98%

Sensitivität = 100%

IgG-Nachweis beim Pferd

Um die Leistungsfähigkeit des Borrelia burgdorferi Veterinär ELISAs zu ermitteln, wurden 119 Seren auf dem VIROTECH Diagnostics ELISA und auf einem Referenztest (Westernblot) getestet. Die Austestungen wurden in den Labors der VIROTECH Diagnostics GmbH, Rüsselsheim durchgeführt.

3 Seren wurden gemeinsam positiv, 69 Seren gemeinsam negativ und 13 Seren gemeinsam grenzwertig getestet. 3 Seren stimmten nicht überein. Grenzwertige Ergebnisse (34) gingen nicht in die Berechnung ein.

Das Ergebnis ist in nachfolgender Tabelle dargestellt:

| | | Referenztest | |
|----------|---|--------------|----|
| | | + | - |
| VIROTECH | + | 3 | 3 |
| | - | 0 | 69 |

Spezifität = 96%

Sensitivität* = 100%

*Rechnerisch ergibt sich eine Sensitivität von 100%. Dieser Wert ist statistisch unsicher, da nur 3 positive Borrelien IgG Seren für die Testungen zur Verfügung standen.

10.2 Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen zwischen *B. burgdorferi* und anderen Spirochäten, vor allem Leptospiren, sind ein viel diskutiertes Problem (5).

Eine Reihe von Leptospiren-positiven Hunde- und Pferdeseren wurde auf ihre Reaktivität im *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA untersucht.

| Borrelia burgdorferi Veterinär ELISA | | | |
|---|----------------|--------------------|----------------|
| Serenkollektiv | Negativ | Grenzwertig | Positiv |
| Leptospiren-positiv Hundeseren (n=50) | 46 | 2 | 2 |
| Leptospiren-positiv Pferdeseren (n=42) | 27 | 6 | 9 |

11. Literatur

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982); Lyme disease – a tick-borne spirochetosis?; Science 216:1317-19.
2. Dressler, F., Ackermann, R. and Steere, A.C. (1994); Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis; J. Infect. Dis. 169:313-318.
3. Sigal, L.H. and Curran, A.S.; Lyme disease: a multifocal worldwide epidemic; Annu. Rev. Publ. Health (1991); 12:85-109.
4. Barbour, A.G. and Hayes, S.F. (1986); Biology of *Borrelia* species; Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
5. Horst, H.; Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier; 3. überarbeitete Auflage; Demeter-Verlag im Spitta Verlag; 1997: 173-174, 176-178.
6. Liebisch, G.; Der Nachweis von Borrelien bei Haus und Wildtieren: Patienten oder Reservoir der Lyme-Borreliose?; 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft; 8.-11. April 1997; Bad Nauheim.

Vorbereitung der Tierseren und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **Proben – Verdünnung**
1:400

z.B.:

10 µl Serum + 90µl Verdünnungspuffer mischen (Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)
von diesem Gemisch 10µl + 390µl Verdünnungspuffer

Testdurchführung

| | | |
|--------------------|----------------------------|--|
| Probeninkubation | 30 Minuten bei 37°C | 100 µl Tierserum Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrollen |
| ↓ | | |
| 4 x Waschen | | 350 µl Waschlösung gut ausklopfen |
| ↓ | | |
| Konjugatinkubation | 30 Minuten bei 37°C | 100 µl Konjugat IgG |
| ↓ | | |
| 4 x Waschen | | 350 µl Waschlösung gut ausklopfen |
| ↓ | | |
| Substratinkubation | 30 Minuten bei 37°C | 100 µl Substrat |
| ↓ | | |
| Abstoppen | | 50 µl Stopplösung vorsichtig schütteln |
| ↓ | | |
| Extinktion messen | | Photometer bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) |