VIROTECH Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Immunoblot

(Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Hund/Dog)

Bestell-Nr.: DE226G32

Borrelia Vet. + OspA IgG LINE Set Pferd/Horse

Bestell-Nr.: DE226K62

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK bei Hunden und Pferden

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH
Waldstrasse 23 A6
63128 Dietzenbach, Deutschland
Tel.: +49 6074 23698-0
Fax: +49 6074 23698-900
E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com
Webseite: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Inhalt

1. Verwendungszweck ... 3
2. Diagnostische Bedeutung ... 3
3. Testprinzip ... 3
4. Packungsinhalt ... 3
4.1 Kit für 32 Bestimmungen ... 3
4.2 Pferde-Set ... 4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien ... 4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise ... 4
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) ... 5
8. Testdurchführung ... 5
8.1 Vorbereitung der Proben ... 5
8.2 Vorbereitung der Reagenzien ... 5
8.3 Immunoblot Testdurchführung ... 5
8.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren ... 6
9. Testauswertung ... 6
9.1 Auswertung der Hunde-/ Pferdeproben ... 6
9.2 Einsatz der Cut off Kontrolle ... 6
9.3 Bedeutung der Antigene ... 6
9.4 Auswertungskriterien ... 8
9.5 Grenzen des Tests ... 9
10. Leistungsdaten ... 9
10.1 Hund ... 10
10.2 Pferd ... 10
11. Literatur ... 10
12. Testablaufschema ... 12

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH Borrelia Veterinär plus OspA Line ist ein Line Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* sensu lato spezifischen IgG-Antikörpern im Hunde- oder Pferdeserum. Mit diesem Diagnostikum kann beim Hund eine Wildtypinfektion von einer Impfung unterschieden werden.

2. Diagnostische Bedeutung

Allgemeines

Der Erreger der Lyme-Borreliose (LB), die Spirochäte *B. burgdorferi* wurde 1981 von Burgdorfer und Barbour entdeckt und als Spezies der Gattung *Borrelia* klassifiziert (1).

Die Lyme-Borreliose (LB) ist eine systemische Erkrankung, die durch eine Infektion mit der Spirochäte *B. burgdorferi* hervorgerufen wird (7,8). Die Übertragung der Spirochäte erfolgt durch den Stich einer infizierten Zecke. In Europa wurde die Zecke *Ixodes ricinus* als der Hauptvektor (2, 5) identifiziert. Momentan sind für Europa folgende (human-)pathogene *B. burgdorferi* Spezies beschrieben, die unter dem Begriff *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.) zusammengefasst werden: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii, B. garinii*, *B. bavariensis,* und *B. spielmanii* (5, 6, 9, 10, 11).

In welchem Umfang die Tiere (Hund und Pferd) nach erfolgter Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. auch an einer LB erkranken ist momentan unklar. Es ist derzeit davon auszugehen, dass die meisten infizierten Tiere (zunächst) keine klinischen Veränderungen entwickeln. I.d.R. wird ein Tierhalter den Tierarzt erst dann aufsuchen, wenn Symptome (z.B. Lahmheit) auftreten. In dieser Situation ist die IgG-Bestimmung serologisch indiziert (12,13).

Krankheitsbild beim Hund:

Ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Anorexie und Fieber sowie eine wechselnde Lahmheit aufgrund von Arthritis sind die stärksten Hinweise auf das Vorliegen einer LB beim Hund. Neben diesen Symptomen wurden in ca. 5% der Fälle Lymphadenopathien und in ca. 2% der Erkrankungen schwere Nierenfunktionsstörungen beobachtet (3).

Krankheitsbild beim Pferd:

In einer deutschen Studie wurden 50 Pferde auf Krankheitssymptome im Rahmen einer *B.burgdorferi*-Infektion untersucht. Auffällig war der hohe Anteil an Augenerkrankungen (Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis, Retinitis). 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 gefunden, die an nahezu allen Gelenken der Extremitäten auftreten konnten (4).

3. Testprinzip

Proteine des Erreger-Antigens werden durch ein spezielles Sprühverfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulosemembran wird dann in Einzelstreifen geschnitten.

Die Inkubation der antigentragenden Nitrozellulosestreifen mit Hunde- oder Pferdeserum-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit den auf dem Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschritte, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Hund- bzw. anti-Pferd IgG-Konjugaten inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschritt entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung, blau-violette Banden erzeugt. Die Enzym/Substrat-Reaktion wird durch Waschen der Nitrozellulosestreifen mit Aqua dest./deionisiert gestoppt. Abhängig von dem beobachteten Bandenmuster kann man auf das Vorhandensein von spezifischen IgG-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 32 Bestimmungen

1.	**Nitrozellulose Teststreifen** mit aufgesprühten Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	**1x**	**32 Streifen**
2.	**IgG Cut off Kontrolle**, Hundeserum, vorverdünnt, mit Konservierungsmittel	**1x**	**0,5 ml**
3.	**Verdünnungs-/ Waschpuffer**, pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	**2x**	**50 ml**
4.	**Anti-Hund IgG-Konjugat** (100x konz.) Anti-Hund, (Kaninchen)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	**1x**	**0,7 ml**

5. **Substrat (BCIP/NBT),** gebrauchsfertig **1x 57 ml**
6. **Auswertungsprotokollblatt für Hund**
   zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse **1x 1 Stk.**

4.2 Pferde-Set

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich (DE226K62)

1. **IgG Cut off Kontrolle**, Pferdeserum, vorverdünnt, mit Konservierungsmittel **1x 0,5 ml**
2. **Anti-Pferd IgG-Konjugat** (100x konz.)
   Anti-Pferd, (Kaninchen)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel **1x 0,7 ml**
3. **Auswertungsprotokollblatt für Pferd**
   zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse **1x 1 Stk.**

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien

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

4. Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
5. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
6. Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
7. Die BCIP/NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
8. **Nitrozellulose Teststreifen**: Streifen nach der Entnahme aus dem Beutel sofort verwenden. Beutel mit den nicht benötigten Streifen wieder fest verschließen und bei 2-8°C aufbewahren. Zur Archivierung der Ergebnisse sollten die Nitrozellulose Teststreifen unbedingt vor direktem Sonnenlicht geschützt werden, um ein Verblassen der Banden zu vermeiden.

Material	Zustand	Lagerung	Stabilität
Untersuchungsproben	unverdünnt	+2 bis +8°C	1 Woche
Teststreifen	nach Öffnen	+2 bis +8°C (Lagerung im mitgelieferten Beutel)	3 Monate
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	ca. 6h
Substrat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
Verdünnungs-/ Waschpuffer	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3 Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +8°C	4 Wochen
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	*oder* Raumtemperatur	2 Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen sollten als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Bei der Durchführung des Immunoblots sind Einmalhandschuhe zu tragen und eine Plastik-Pinzette zu benutzen.
3. Die Kontrollen, die Konservierungsmittel enthalten, sowie der Verdünnungs-/Waschpuffer und das Substrat wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Das Konjugat enthält ein Konservierungsmittel, das toxisch ist. Bei Berührung, die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell einen Arzt aufsuchen.
4. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
5. Die Inkubationswannen sind vom Hersteller nur für den Einmalgebrauch konzipiert. Ein mehrmaliger Gebrauch der Inkubationswannen liegt in der Verantwortung des Anwenders. Bei evtl. Mehrfachverwendung empfehlen wir, die Inkubationswannen nach Gebrauch mehrere Stunden in 1% Natriumhypochloritlösung zu desinfizieren, zu reinigen und gründlich mit Leitungswasser und Aqua dest./deionisiert zu spülen.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Inkubationswanne (Bestellnummern entnehmen sie bitte dem Produktkatalog)
2. Schüttler (vertikal nicht zentrifugal)
3. Eine Spritzflasche zum Abstoppen
4. Pipette oder Handwaschgerät
5. Mikropipetten 5 µl - 1500 µl
6. Pipettenspitzen
7. Probenröhrchen (Tubes) 2-20 ml Volumen
8. Plastikpinzette
9. Aqua dest. oder deionisiert
10. Filterpapier

8. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für die Erzielung korrekter Ergebnisse.

8.1 Vorbereitung der Proben

1. Pro Probe werden 15 µl Serum benötigt
2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen. Die Proben können 1 Woche bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Getrübte Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
2. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
   Verdünnungs-/ Waschpuffer
   Der Verdünnungs-/ Waschpuffer liegt 10-fach konzentriert vor. Das Verdünnungs-/ Waschpufferkonzentrat 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen (10ml/50ml/100ml Konzentrat + 90ml/450ml/900ml A. dest./deionisiert), gut mischen. Sowohl der konzentrierte als auch der verdünnte Verdünnungs-/ Waschpuffer können eventuell eine Gelbfärbung aufweisen. Diese Gelbfärbung hat weder Einfluss auf die Haltbarkeit des Verdünnungs-/ Waschpuffers, noch auf die Funktionalität und diagnostische Aussagekraft des Testansatzes.
3. **IgG- Konjugat**
   Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/ Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: „Testablaufschema“).
4. **Substratlösung**
   Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

8.3 Immunoblot Testdurchführung

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung des LINEs, muss bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

1. Die Testdurchführung erfolgt bei Raumtemperatur.
2. Für jede Probe je 1 Streifen in die Rinne einer sauberen Inkubationswanne legen. Streifen möglichst nur am markierten oberen Ende anfassen.
3. Je 1,5ml gebrauchsfertigen **Verdünnungs-/Waschpuffer** pipettieren und auf den Schüttler stellen. Darauf achten, dass die Nitrozellulose Teststreifen gleichmäßig mit Flüssigkeit bedeckt sind, die Streifen dürfen während der gesamten Testdurchführung nicht trocknen.
4. Die verstärkten Nitrozellulose Teststreifen sind innerhalb einer Minute vollständig befeuchtet und können in Rücken-, Bauch- oder Seitenlage inkubiert werden.

5. Je **15µl Hunde-/ Pferdeserum** (ergibt eine Verdünnung von 1+100) bzw**. 100µl der cut off Kontrolle** hzupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Hunde-/ Pferdeserum und Kontrolle **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen darauf achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der einzelnen Patientenproben kommt.
6. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen, oder vorsichtig abgießen. Beim Abgießen der Flüssigkeit bleiben die Nitrozellulose Teststreifen am Boden der Rinnen haften. Restflüssigkeit auf einem Saugpapier abtropfen.
7. **Waschen** der Streifen: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Vor Ablauf des letzten Waschschrittes die benötigte Menge an frischer Konjugatverdünnung (s. Tabelle) herstellen.
8. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
9. Je 1,5 ml der hergestellten **Konjugatverdünnung** in die entsprechenden Inkubationsrinnen pipettieren und **30 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren.
10. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen.
11. **Waschen** der Streifen: mit je 1,5 ml gebrauchsfertigem Verdünnungs-/Waschpuffer **3 x 5 Minuten** auf dem Schüttler inkubieren. Waschpuffer immer vollständig absaugen oder abgießen. Anschließend **1 x 1 Minute** mit **Aqua dest./deionisiert** spülen.
12. Flüssigkeit aus den Rinnen vollständig absaugen oder abgießen (siehe Punkt 6).
13. Je 1,5 ml gebrauchsfertige **Substratlösung** in die Rinnen pipettieren und **10 ± 3 Minuten** auf dem Schüttler entwickeln.
14. Farbentwicklung **stoppen** durch Abgießen der Substratlösung. Anschließend Streifen ohne Zwischeninkubation **3 x** mit je 1,5 ml **Aqua dest./deionisiert** waschen.
15. Aqua dest./deionisiert abgießen und Streifen auf einem sauberen saugfähigen Papier trocknen. Die Hintergrundfärbung, die bei feuchten Nitrozellulose Teststreifen beobachtet werden kann, geht bei den getrockneten Steifen vollständig zurück. Verstärkte Nitrozellulose Teststreifen benötigen im Vergleich zu den herkömmlichen Nitrozellulose Teststreifen etwas länger, bis sie getrocknet sind.
16. Zur Auswertung das beigefügte Auswertungsprotokoll verwenden. Die Beschriftung der spezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtern die Auswertung der Hunde-/ Pferdeproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

8.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung des LINES sind folgende Geräte validiert: Profiblot und Apollo
Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

9. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit einer Testfunktionskontrolle (Serumkontrolle) ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control).
   Der Testkit verfügt über eine gemeinsame Serumkontrollbande für Hund und Pferd:

   Nur nach Inkubation mit Serum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.
   Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen die Serumkontrolle deutlich zu erkennen ist. Die Position der Serumkontrollbande wird dem Protokollblatt entnommen.

9.1 Auswertung der Hunde-/ Pferdeproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie dem Protokollblatt.
IgG-Banden: VlsE-Mix-Hund, OspA-Mix, DbpA-Mix, OspC-Mix, BmpA (p39), p58, p83, VlsE-Mix-Pferd

9.2 Einsatz der Cut off Kontrolle

Banden deren Intensität schwächer als die Cut off Bande der cut off Kontrolle sind, werden nicht in die Bewertung einbezogen.
IgG Hund Cut off Bande: OspA-Mix
IgG Pferd Cut off Bande: VlsE-Mix

9.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten hoch aufgereinigten und rekombinanten *B. burgdorferi*-Antigene:

1. Der **VlsE-Mix** besteht aus zwei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto (B31) und

B. garinii (IP90).

2. Der **OspA-Mix** besteht aus drei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. afzelii* (PKo), *B. garinii ZQ1 und* B.*burgdorferi s.s.ZS7.*
3. Der **OspC-Mix** besteht aus drei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. afzelii* (PKo), *B. bavariensis* (PBi) und *B. burgdorferi* sensu stricto (ZS7).
4. Der **DbpA-Mix** besteht aus zwei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. bavariensis* (PBi) und *B. garinii* (PBr) und dem hochaufgereinigten *B. afzelii* (PKo).

Antigen/ Bezeichnung	**Bedeutung der Antigene**	**Spezifität der Antikörper im LINE**
VlsE-Mix rekombinant	**V**ariable major protein **l**ike **s**equence **E**. *In vivo*-exprimiertes Lipoprotein, das konservierte – Genospezies-übergreifende – hoch immunogene Epitope aufweist – VlsE ist ein 35 kDa-Antigen, das auf lp28-1 kodiert ist. Biologische Bedeutung: *B. burgdorferi* s.l. kann in infizierten Säugern, trotz deren aktiven Immunantwort, persisiteren. Es wird vermutet, dass die kombinatorische Antigenvariation des VlsE-Oberflächenproteins - als „immune escape"-Mechanismus - zu dieser Persistenz beiträgt. Marker für Erregerkontakt bzw. Wildinfektion mit *B. burgdorferi* s. l.	Spezifisch
OspA-Mix rekombinant	**O**uter **s**urface **p**rotein **A** • OspA-Antikörpertiter finden sich insbesondere nach Impfungen	Hochspezifisch
DbpA-Mix hochaufgereinigt/ rekombinant	**D**ecorin **b**inding **p**rotein **A** (auch Outer surface protein 17 oder p17). Plasmidkodiertes Lipoprotein. Die DbpAs aus verschiedenen Isolaten der Spezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii, B. bavariensis* und *B. spielmanii* wurden als sensitive und spezifische Antigene – die sich gegenseitig in ihrer Reaktivität ergänzen – beschrieben. • DbpA-Antikörper finden sich eher bei fortgeschrittenen/disseminierten Lyme-Borreliose-Infektionen	Hochspezifisch
OspC-Mix (p23) rekombinant	**O**uter **s**urface **p**rotein **C**. Plasmid kodiertes Lipoprotein Oberflächenprotein • OspC-Antikörper finden sich sowohl bei Wildinfektionen wie gelegentlich auch nach Impfungen	Hochspezifisch
BmpA (p39) Rekombinant *B.afzelii* (PKo)	**B**orrelial **m**embrane **p**rotein **A**. Chromosomal kodierter, zentraler Marker in der IgG-Serologie für disseminierte Lyme-Borreliose-Infektionen.	Hochspezifisch
p58 rekombinant *B.bavariensis* (PBi)	**O**ligopeptide **p**ermease **p**rotein **A**-2 (OppA-2). Chromosomal kodiertes Lipoprotein, welches zwischen den Spezies konserviert ist. • p58-Antikörper finden sich eher bei fortgeschrittenen / disseminierten Lyme-Borreliose-Infektionen	Hochspezifisch
p83 rekombinant	Chromosomal kodiertes, Protoplasmazylinder-assoziiertes Antigen, konserviert innerhalb von *B. burgdorferi* sensu lato.	Hochspezifisch

***B.afzelii* (PKo)**	Zentraler Marker in der IgG-Serologie für fortgeschrittene Lyme-Borreliosen.	

9.4 Auswertungskriterien

9.4.1 Auswertekriterien beim Hund:

Empfohlene IgG Beurteilung beim Hund

Angaben grundsätzlich für Banden ≥ cut off Bandenintensität. Ausnahme: isoliertes VlsE

Hund	Befund	Interpretation
0 Banden oder Banden < cut off	negativ	kein Hinweis auf einen relevanten Erregerkontakt

VlsE-Hund		Befund	Interpretation
isoliert	= cut off	negativ	kein Hinweis auf einen relevanten Erregerkontakt
	> cut off	Infektion	Hinweis auf Infektion
+ ≥ 1 Bande (außer OspA)		Infektion	Hinweis auf Infektion

ohne OspA und ohne VlsE-Hund	Befund	Interpretation
0 - 1 Bande	negativ	kein Hinweis auf einen relevanten Erregerkontakt
2 - 3 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
≥ 4 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion

OspA		Befund	Interpretation
isoliert oder + ≥ 1 Banden (außer VlsE)		Impfung	Impfung
+ VlsE-Hund isoliert	= cut off	Impfung	Impfung
	> cut off	Impfung + Infektion	Impfung und Hinweis auf Infektion
+ VlsE-Hund + ≥ 1 Bande		Impfung + Infektion	Impfung und Hinweis auf Infektion

In die IgG-Beurteilung Hund wird die VlsE-Bande Pferd nicht miteinbezogen.

Bei negativen bzw. grenzwertigen Befund sollte bei weiterem klinischem Verdacht sowohl beim Hund, als auch beim Pferd nach ca. 4-6 Wochen eine zweite Blutentnahme erfolgen.

IgG Antikörper können auch Jahre nach einer klinischen Remission noch nachweisbar sein. Das Auftreten von Banden unterhalb der Bewertungsgrenze kann auf eine vorangegangene Infektion zurückzuführen sein.

9.4.2 Auswertekriterien beim Pferd:

Empfohlene IgG Beurteilung beim Pferd
Angaben grundsätzlich für Banden ≥ cut off Bandenintensität

Pferd	Befund	Interpretation
0 Banden oder Banden < cut off	negativ	kein Hinweis auf einen relevanten Erregerkontakt

VlsE-Pferd	Befund	Interpretation
+ 0 - 2 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
+ ≥ 3 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion

Sonderfall	Befund	Interpretation
VlsE-Pferd + DbpA + 1 Bande	Infektion	Hinweis auf Infektion

ohne VlsE-Pferd	Befund	Interpretation
0 - 2 Banden	negativ	kein Hinweis auf einen relevanten Erregerkontakt
3 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
≥ 4 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion

In die IgG-Beurteilung Pferd wird die VlsE-Bande Hund nicht miteinbezogen.
OspA ist bei equinen Immunreaktionen auf *B. burgdorferi* s.l. nicht als spezifische Proteinbande einzustufen.

Bei negativem bzw. grenzwertigem Befund sollte bei weiterem klinischem Verdacht sowohl beim Hund, als auch beim Pferd nach ca. 4-6 Wochen eine zweite Blutentnahme erfolgen.
IgG Antikörper können auch Jahre nach einer klinischen Remission noch nachweisbar sein. Das Auftreten von Banden unterhalb der Bewertungsgrenze kann auf eine vorangegangene Infektion zurückzuführen sein.

9.5 Grenzen des Tests

1. Bei der Interpretation serologischer Ergebnisse sollte **immer** das klinische Bild und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbezogen werden.
2. Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Borrelien-Infektion nicht vollständig aus, da der Antikörpertiter zu diesem Zeitpunkt noch unter der Nachweisgrenze des Tests liegen kann. Bei weiterem Verdacht sollte eine zweite Blutabnahme nach ca. 4-6 Wochen erfolgen.
3. IgG-Antikörper können auch Jahre nach einer klinischen Remission noch nachweisbar sein.
4. Kreuzreaktionen zwischen *B. burgdorferi* s.l. und anderen Spirochäten, vor allem Leptospiren, sind ein bekanntes Phänomen.

10. Leistungsdaten

Herkunft der Seren:
Es wurden 217 definierte Hundeseren und 149 definierte Pferdeseren aus der Tierärztlichen Fakultät, Veterinärwissenschaftliches Department, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Prof. Dr. Reinhard Straubinger, für die Evaluierung herangezogen.
Die Vergleichstestung zum Zweistufentest der Tierärztlichen Fakultät, der in dieser Testung als Standard definiert wurde, wurde im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen des Veterinärwissenschaftlichen Departments unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Straubinger in München durchgeführt und ergab folgende Ergebnisse:

10.1 Hund

Test bzw. Auswertungsverfahren	Hundeseren (n=217)			
Beurteilung nach dem **Zweistufentest** Prof. Straubinger	49 negativ	46 Impfung	94 Infektion 8 grenzwertig	20 Impfung + Infektion
Borrelia Veterinär plus OspA LINE	49 negativ	42 Impfung 3 Impfung + Infektion 1 negativ	95 Infektion 2 grenzwertig 3 Impfung + Infektion 2 negativ	18 Impfung + Infektion 1 Impfung 1 Infektion

Die negativen Seren werden einwandfrei getroffen.
Impfungen werden zu 98% detektiert, hinzu kommen 3 zusätzliche Infektionshinweise. Der einzige Negative war im Zweistufentest als „Schwache Impfung“ eingeordnet und zeigte im Lineblot zwar eine deutliche OspA Bande allerdings < cut off.
Bei den Infektionen werden grenzwertige Fälle deutlich reduziert. Es werden zusätzlich 3 Impfungen detektiert.
Bei den Impfungen + Infektionen können 18 Fälle so bestätigt werden. 1 Fall wird als reine Impfung und 1 Fall als reine Infektion gefunden.

10.2 Pferd

Test bzw. Auswertungsverfahren	Pferdeseren (n=149)		
Beurteilung nach dem **Zweistufentest** Prof. Straubinger	50 negativ	41 grenzwertig 9 grenzwertig/negativ	45 Infektion 4 Infektion/ Antigenkontakt
Borrelia Veterinär plus OspA LINE	50 negativ	16 grenzwertig 7 Infektion 27 negativ	33 Infektion 11 grenzwertig 5 negativ

Diese Darstellung zeigt, dass mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE mehr equine Seren als klar negativ eingestuft werden können, die vorher zumeist als positiv/grenzwertig befundet wurden.
Dies entspricht auch eher der diagnostischen Realität. Laut tierärztlicher Fakultät, Labor Prof. Straubinger geht aus Erfahrungsberichten hervor, dass die bisher verwendeten Testsysteme und Auswertungskriterien tendenziell viele positive Ergebnisse anzeigen, die als nicht aussagekräftig für eine abschließende Befunderhebung gewertet werden mussten.

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. Barbour, A.G. and Hayes, S.F. (1986); Biology of Borrelia species; Microbiol. Rev. 50(4):381-400.
3. Horst, H.; Zeckenborreliose Lyme-Krankheit bei Mensch und Tier; 4. überarbeitete Auflage; Demeter-Verlag im Spitta Verlag; 2003: 194-208;210-215;216-228
4. 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.
5. Pfister,H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. 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
7. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
8. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.

9. Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B. (2007) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Med Microbiol
10. Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., van Dam, A., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, P. (2007) Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resist complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and FHL-1. Infect Immun
11. Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J. (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. J Clin Microbiol 37: 3025-3028
12. Krupka,I.(2010) Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato und deren serologischer Nachweis mittels spezifischer C6-Peptide bei Hunden sowie im murinen Infektionsmodell ; Inaugural-Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig : 1 ; 8-10
13. Krupka I , Pantchev N, Weise M, Straubinger RK. Durch Zecken übertragbare bakteriielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. Praktischer Tierarzt 2007 ;10(88) :776-87
14. May Katharina,(2009) Enzym-Immunoassay und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato bei gesunden Pferden ; Inaugural-Dissertation der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich

12. Testablaufschema

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	**30 Minuten**	15 µl Hunde-/Pferdeserum /100 µl Kontrolle in je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Waschen	**3 x 5 Minuten**	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	**30 Minuten**	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	**3 x 5 Minuten** **1 x 1 Minute**	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	**10 ± 3 Minuten**	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	**3 x ohne Zwischeninkubation**	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert

Konjugatverdünnungstabelle für Hunde – und Pferdekonjugat anzuwenden: (gerundet)

Anzahl Streifen	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Verdünnungs/ Waschpuffer	1,5ml	3,0ml	4,5ml	6,0ml	7,5ml	9,0ml	11,0ml	12,0ml	14,0ml	15,0ml
Konjugat-Konzentrat	15µl	30µl	45µl	60µl	75µl	90µl	110µl	120µl	140µl	150µl
Endvolumen	1,515ml	3,03ml	4,545ml	6,06ml	7,575ml	9,09ml	11,11ml	12,12ml	14,14ml	15,15ml

Anzahl Streifen	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
Verdünnungs/ Waschpuffer	17,0ml	18,0ml	20,0ml	21,0ml	23,0ml	24,0ml	26,0ml	27,0ml	29,0ml	30,0ml
Konjugat-Konzentrat	170µl	180µl	200µl	210µl	230µl	240µl	260µl	270µl	290µl	300µl
Endvolumen	17,17ml	18,18ml	20,2ml	21,21ml	23,23ml	24,24ml	26,26ml	27,27ml	29,29ml	30,3ml

Anzahl Streifen	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
Verdünnungs/ Waschpuffer	32,0ml	33,0ml	35,0ml	36,0ml	38,0ml	39,0ml	41,0ml	42,0ml	44,0ml	45,0ml
Konjugat-Konzentrat	320µl	330µl	350µl	360µl	380µl	390µl	410µl	420µl	440µl	450µl
Endvolumen	32,32ml	33,33ml	35,35ml	36,36ml	38,38ml	39,39ml	41,41ml	42,42ml	44,44ml	45,45ml

Anzahl Streifen	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**
Verdünnungs/ Waschpuffer	47,0ml	48,0ml	50,0ml	51,0ml	53,0ml	54,0ml	56,0ml	57,0ml	59,0ml	60,0ml
Konjugat-Konzentrat	470µl	480µl	500µl	510µl	530µl	540µl	560µl	570µl	590µl	600µl
Endvolumen	47,47ml	48,48ml	50,5ml	51,51ml	53,53ml	54,54ml	56,56ml	57,57ml	59,59ml	60,6ml