

**VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA
(Borrelia + VlsE IgG EU ELISA)**

Bestell-Nr.: EC024G00 Farbcodierung: gold/rot

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards

Bestell-Nr.: EC022L60

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Bestell-Nr.: EN022L65

Inkl. Leistungsdaten Liquordiagnostik

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**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	4
4. Packungsinhalt	4
4.1 Packungsinhalt (IgG Testkit)	4
4.2 Packungsinhalt (IgG Liquor Standards)	5
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	5
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)	5
8. Testdurchführung SERUMDIAGNOSTIK	6
8.1 Untersuchungsmaterial	6
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	6
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung	6
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
9. Testauswertung SERUMDIAGNOSTIK	7
9.1 Testfunktionskontrolle	7
9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)	7
9.3 Auswertungsschema IgG	7
9.4 Grenzen des Tests	8
10. Leistungsdaten SERUMDIAGNOSTIK	8
10.1 Diagnostische Sensitivität	8
10.2 Diagnostische Spezifität	8
10.3 Methodenvergleich	8
10.4 Kreuzreaktivität	9
10.5 Prävalenz	9
10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)	9
10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)	9
11. Leistungsdaten LIQUORDIAGNOSTIK	10
11.1 Sensitivität und Spezifität	10
11.2 Kreuzreaktivität	10
12. Literatur	11
13. Testablaufschemata SERUMDIAGNOSTIK	12

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA dient als Suchtest (Screening-Test) dem semiquantitativen und qualitativen Nachweis von IgG Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato im Humanserum und ist gleichzeitig geeignet, durch Paralleluntersuchung von Serum-Liquor-Paaren den quantitativen Nachweis von ZNS-eigener IgG-Antikörpersynthese zu führen.

2. Diagnostische Bedeutung

Die Lyme-Borreliose ist eine systemische Erkrankung, die durch eine Infektion mit der Spirochäte *Borrelia burgdorferi* hervorgerufen wird (1,2). Die Übertragung der Spirochäte auf den Menschen erfolgt durch den Stich einer infizierten Zecke. In Europa wurde die Zecke *Ixodes ricinus* als der Hauptvektor (5) identifiziert. Momentan sind für Europa mindestens drei humanpathogene *Borrelia burgdorferi* Species beschrieben, die unter dem Begriff *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) zusammengefasst werden: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* (3,5,6)

Bei der Lyme-Borreliose handelt es sich um eine in Stadien ablaufende Multisystemerkrankung mit vorwiegender Beteiligung der Haut, der Gelenke und des Nervensystems. Wegen der großen Spannweite der auftretenden klinischen Manifestationen, ist die Diagnose der Lyme-Borreliose schwierig (5). Differentialdiagnostisch bedeutsam ist u.a. die Abgrenzung gegenüber verschiedenen dermatologischen (z.B.: B-Zell-Lymphom der Haut, Lupus erythematodes), neurologischen (z.B.: Multiple Sklerose) und internistischen (z.B.: Arthritis, Karditis) Erkrankungen (15).

Die serologische Diagnostik der Lyme-Borreliose wird u.a. durch folgende Faktoren erschwert:

- eine negative Serologie schließt – besonders in den frühen Stadien – eine Lyme-Borreliose nicht aus. Das Erythema migrans (Primärstadium) ist sogar in etwa 50% der Fälle seronegativ (14)
- die Bildung von IgM-Antikörper kann ganz ausbleiben
- IgM-Antikörper können über viele Monate persistieren (10,11)
- IgG-Antikörper können auch Jahre nach einer klinischen Remission noch nachweisbar sein (10,11)
- es wurden Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen beobachtet (8,13). Eine wichtige Rolle nehmen dabei bakteriell bedingte Erkrankungen wie Syphilis und Herpes-Virus-Infektionen (insbesondere EBV) ein (12). Falsch positive Antikörperantworten können auch bei Vorhandensein von Autoimmun-Antikörpern auftreten (13).

Die Aufgabe der Lyme-Borreliose-Serologie besteht in der unterstützenden Abklärung eines klinisch begründeten Verdachts. Dabei kann die Lyme-Borreliose-Serologie wichtige Informationen über Seronegativität liefern oder den Verdacht auf das Vorliegen einer frischen Infektion sowie einer fortgeschrittenen Infektion erhärten. Ein positiver Antikörperbefund muß aber unbedingt im Zusammenhang mit dem klinischen Bild beurteilt werden (14).

Es wird empfohlen, die Lyme-Borreliose-Serologie in zwei Stufen durchzuführen (16). In der ersten Stufe werden die zu untersuchenden Proben mit einem sensitiven Suchtest befundet (die MiQ12/2000 empfiehlt als Suchtest einen ELISA einzusetzen). Grenzwertige und positive Seren werden anschließend in einem Bestätigungstest (Line Immuno Assay/Western Blot) weiter untersucht. Die Analyse im Westernblot ermöglicht die spezifische Analyse der gegen einzelne Erregerantigene gerichteten Antikörperantwort.

Als neuste Entwicklung stehen jetzt auch *in vivo*-exprimierte Antigene für die Diagnostik zur Verfügung. Das besondere an diesen Antigenen ist, dass sie von den Borrelien erst im infizierten Säugetierwirt (Mensch) *in vivo* exprimiert werden. Herausragend unter diesen neuen *in vivo*-exprimierten Antigenen ist das Genospezies übergreifende Protein VlsE (17, 18, 19). Dieses ist insbesondere in der IgG-Serologie ein zweiter Frühmarker neben OspC. Hier hat sich in Untersuchungen gezeigt, dass bei frühen Borreliosen neben dem OspC im IgM auch das VlsE im IgG häufig zu finden ist, und dass so die Sensitivität in der Diagnostik der frühen Lyme-Borreliosen entscheidend gesteigert werden kann.

Neuroborreliose

Im Rahmen einer Borrelioseinfektion bezeichnet man Symptome, die das Nervensystem betreffen, als Neuroborreliose. 10-15% der Patienten mit Borreliose entwickeln eine Neuroborreliose. Diese tritt im Mittel fünf Wochen nach dem Zeckenstich auf. Bei Patienten mit Neuroborreliose kann die klinische Verdachtsdiagnose durch entzündliche Liquorveränderungen und den Nachweis einer borrelienspezifischen intrathekalen Antikörpersynthese bestätigt werden. Die intrathekale spezifische

Antikörperproduktion wird durch die Bestimmung des Antikörper-Index nachgewiesen. Die *B. afzelii*-spezifische intrathekale Antikörperproduktion entwickelt sich bei unbehandelten Patienten in der 2. Krankheitswoche, ist nach 3 Wochen bei etwa 75% der Patienten nachweisbar und nach 8 Wochen bei über 99% der Patienten. Bei Patienten mit Symptomen über einen Zeitraum von mehr als 2-3 Monaten schließt ein negativer Borrelien-Antikörper-Test die Möglichkeit einer Neuroborreliose fast aus. Der positive Nachweis borrelienspezifischer Antikörper allein weist keine aktive Infektion mit *Borrelia afzelii* nach. Umgekehrt kann in der frühen Phase einer Borrelienerkrankung – insbesondere bei frühzeitiger antibiotischer Behandlung – die Borrelienserologie negativ sein (9). Bei einer akuten Neuroborreliose kann unter Umständen die IgG-Synthese unterbleiben, so dass nur IgM-Antikörper zu finden sind (20).

Bei dem eingesetzten Antigen handelt es sich um eine Mischung aus dem für Europa empfohlenen *B. afzelii* Stamm PKo (ursprünglich isoliert aus menschlicher Erythema migrans Lesion in Deutschland), dem *B. garinii* Stamm PBr (ursprünglich isoliert aus der Zerebrospinalflüssigkeit eines Neuroborreliose Patienten in Deutschland), dem *B. burgdorferi* Stamm ZS7 (ursprünglich isoliert aus einer infizierten Zecke in Deutschland) und dem *B. burgdorferi* B31 (ursprünglich isoliert von einer infizierten Zecke auf Shelter Island, N. Y.).

Stamm	Antigen	Beschreibung	Aufreinigung	Spezifität der Antigene
<i>Borrelia afzelii</i> PKo	Lysat Antigen	Bakterielles Zellysat, enthält alle nativen Antigene	Rohzelleextrakt in Phosphatpuffer	sensitiv
<i>Borrelia burgdorferi</i> ZS7	Lysat Antigen	Bakterielles Zellysat, enthält alle nativen Antigene	Rohzelleextrakt in Phosphatpuffer	sensitiv
<i>Borrelia garinii</i> PBr	Lysat Antigen	Bakterielles Zellysat, enthält alle nativen Antigene	Rohzelleextrakt in Phosphatpuffer	sensitiv
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	VlsE, rekombinant	Variable major protein like sequence E. <i>In vivo</i> -exprimiertes Lipoprotein, das konservierte – Genospezies-übergreifende – hoch immunogene Epitope aufweist. In der IgG-Serologie werden Reaktivitäten gegen VlsE bei Seren von Patienten mit frühen und mit fortgeschrittenen Lyme-Borreliosen beobachtet. VlsE fungiert in der IgG-Serologie als Erkrankungsstadium-übergreifender Lyme-Borreliose Marker. VlsE ist ein 35 kDa-Antigen, das auf lp28-1 kodiert ist.	Gereinigt aus <i>E. coli</i> über Ni-NTA-Affinitätschromatographie	spezifisch

3. Testprinzip

Der im Humanserum 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

4.1 Packungsinhalt (IgG Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte**, 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, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
5. **IgG cut-off Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
6. **IgG positive Kontrolle, 2000µl**, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
7. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
8. **Tetramethylbenzidin Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, gebrauchsfertig

- Citrat-Stopplösung, 6ml, enthält ein Säuregemisch

4.2 Packungsinhalt (IgG Liquor Standards)

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards zur Quantifizierung erregerspezifischer Antikörperkonzentrationen, 4 Fläschchen à 1000 µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = willkürliche Messeinheiten)

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.

- 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.
- 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.
- 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
RF Sorbo Tech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
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

- Als Kontrollseren werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
- Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, Citrat-Stopp-Lösung 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.
- Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

- Aqua dest./demin.
- Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
- Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
- Reagenzgläser
- Zellstofftücher
- Abdeckung für ELISA-Platten
- Abfallbehälter für infektiöses Material
- ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
- Brutschrank

8. Testdurchführung SERUMDIAGNOSTIK

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

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Patienten-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 VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die gebrauchsfertigen Kontrollen (positive Kontrolle, cut-off Kontrolle, negative Kontrolle) sind parameterspezifisch und ausschließlich mit der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Plattencharge zu verwenden.

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 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der negativen-, cut-off und der positiven IgG-Kontrolle, sowie der verdünnten Patientenseren pipettieren. Wir empfehlen jeweils einen Doppelansatz (Leerwert, Kontrollen und Patientenseren); bei der cut-off Kontrolle ist ein Doppelansatz zwingend notwendig. Arbeitsverdünnung der Patientenseren: 1+100; z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4 maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation der Konjugate: 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 eine einheitliche gelbe 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.

Testablaufschemata 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 SERUMDIAGNOSTIK

Die gebrauchsfertigen Kontrollen dienen einer semiquantitativen Bestimmung spezifischer IgG-Antikörper, deren Konzentration in VIROTECH Einheiten (=VE) angegeben wird. Durch die Testdurchführung bedingte Schwankungen werden über die Berechnungsmethode ausgeglichen und es wird damit eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht. Für die Berechnung der VE werden die Mittelwerte der OD-Werte eingesetzt.

9.1 Testfunktionskontrolle

a) OD-Werte

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

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

b) VIROTECH Einheiten (VE)

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

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

9.2 Berechnung der VIROTECH Einheiten (VE)

Die Extinktion des Leerwertes (450/620nm) muss von allen Extinktionen abgezogen werden.

$VE \text{ (positive Kontrolle)} = \frac{OD \text{ (positive Kontrolle)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$
$VE \text{ (Patientenserum)} = \frac{OD \text{ (Patientenserum)}}{OD \text{ (cut-off Kontrolle)}} \times 10$

9.3 Auswertungsschema IgG

Ergebnis (VE)	Beurteilung
< 9,0	negativ
9,0 - 11,0	grenzwertig
> 11,0	Positiv

1. Liegen die gemessenen VE der Probe oberhalb des grenzwertigen Bereiches, so werden die Proben als positiv betrachtet.
2. Befinden sich die gemessenen VE innerhalb des angegebenen grenzwertigen Bereiches, 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 5-10 Tage später (rekonvaleszentes Serum) 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 grenzwertigen Bereiches, sind keine messbaren antigenspezifischen Antikörper in der Probe vorhanden. Die Proben werden als negativ betrachtet.

9.4 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. Die Kreuzreaktion zwischen Borrelia und anderen Spirochaeten kann ein falsch positives Ergebnis zur Folge haben. Seren von Patienten mit folgenden Infektionen können kreuzreagieren: Syphilis (*Treponema pallidum*), Frambösie (*Treponema pertenue*), Rückfallfieber (Borrelia spez.), Leptospirosen (Leptospiren spez.). Ebenso kann es bei Herpes Erkrankungen (CMV, HSV, Parvovirus) zu Kreuzreaktionen kommen (12, 13).
3. Im Verlauf einer EBV-Infektion (Infektiöse Mononukleose) kann es zur unspezifischen Bildung von Anti-Borrelia-Antikörpern, vor allem der IgM-Klasse kommen (12, 13).

10. Leistungsdaten SERUMDIAGNOSTIK

10.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurden insgesamt 79 klinisch charakterisierte Proben von Patienten mit Lyme-Borreliose Frühmanifestationen (n=36), mit Neuroborreliose (n=11), mit Lyme-Arthritis (n=12) und mit ACA (n=20) auf dem VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA getestet. Die diagnostische Sensitivität wurde für die einzelnen klinischen Phasen separat ermittelt. Grenzwertige Proben (n=3) wurden bei der Berechnung der diagnostischen Sensitivität nicht berücksichtigt.

Diagnostische Sensitivität Frühmanifestation	negativ	grenzwertig	positiv	Sensitivität [%]
	12	2	22	64,7

Diagnostische Sensitivität ACA	negativ	grenzwertig	positiv	Sensitivität [%]
	0	0	20	100

Diagnostische Sensitivität Lyme-Arthritis	negativ	grenzwertig	positiv	Sensitivität [%]
	0	0	12	100

Diagnostische Sensitivität Neuroborreliose	negativ	grenzwertig	positiv	Sensitivität [%]
	1	1	9	90,0

10.2 Diagnostische Spezifität

Zur Ermittlung der diagnostischen Spezifität wurden insgesamt 93 Proben von gesunden Blutspendern aus Deutschland mit einem Referenz ELISA getestet. Die auf dem Referenztest negativen Proben wurden anschließend auf dem VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA getestet. Die diagnostische Spezifität wurde ermittelt. Grenzwertige Proben (n=2) wurden bei der Berechnung der diagnostischen Spezifität nicht berücksichtigt.

Diagnostische Spezifität	negativ	grenzwertig	positiv	Spezifität [%]
	87	2	4	95,6

10.3 Methodenvergleich

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden positive, klinisch charakterisierte Proben von Patienten mit Lyme-Borreliose (n=79) sowie Proben von gesunden Blutspendern aus Deutschland (n=101) im VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA und mit einem Referenz ELISA getestet.

Probenkollektiv (n=180)		Referenztest		
		negativ	grenzwertig	positiv
VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA	negativ	94	5	3
	grenzwertig	4	0	2
	positiv	8	3	61

Bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden die grenzwertigen Proben nicht berücksichtigt.

Daraus ergibt sich für den VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA eine Sensitivität von 95%.

Daraus ergibt sich für den VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA eine Spezifität von 92%.

10.4 Kreuzreaktivität

Mit *Treponema* positiven Seren sind Kreuzreaktionen bekannt.

Im Rahmen von Herpes-Virus-Infektionen (überwiegend bei EBV) kann es zur Bildung Borrelien-reaktiver Antikörper kommen.

Seltener kommt es zu Kreuzreaktionen mit Mycoplasma-, Helicobacter pylori-, CMV-, Parvo- und Yersinienseren, sowie mit Autoimmunsereen.

Auf dem VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA wurden *Treponema pallidum* positive Seren, EBV positive Seren sowie Autoimmunsereen hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivitäten untersucht:

Kollektiv	pos	neg	gw	Summe
<i>Treponema pallidum</i> pos. Seren	4	8	10	22
EBV pos. Seren	0	9	1	10
Autoimmunsereen	1	14	0	15

10.5 Prävalenz

Es wurde ein Panel von 101 Proben von gesunden Blutspendern aus Deutschland mit dem VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA getestet.

VIROTECH Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA	negativ	grenzwertig	positiv
Probenkollektiv (n=101)	89	3	9

Dies ergibt eine Durchseuchungsrate von 8,9%.

In der Literatur sind im Zeitraum von 1989-2012 Durchseuchungsraten von 4-15% beschrieben (23).

10.6 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt < 9%.

10.7 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden jeweils 3 Seren getestet. Die so ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 15%.

11. Leistungsdaten LIQUORDIAGNOSTIK

Der Nachweis einer spezifischen intertekalen Antikörperproduktion basiert auf der Antikörper-Index-Bestimmung nach Reiber (21).

11.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der **diagnostischen** Sensitivität wurden definierte Neuroborreliose-positive Liquor-Serumpaare im VIROTECH ELISA getestet.

diagnostische Sensitivität IgG

	n	%
Summe	26	100
pathologisch	26	100
normal	0	0

Die Sensitivität beträgt > 99,9%. Sie liegt damit im Bereich der in der MIQ angegebenen Sensitivität der Antikörpernachweisverfahren in der Lyme-Borreliose-Diagnostik Stadium II / III (70-100%).

Zur Bestimmung der **diagnostischen** Spezifität wurden definierte ZNS-negative Liquor-Serumpaare im VIROTECH ELISA getestet.

diagnostische Spezifität IgG

	n	%
Summe	19	100
pathologisch	0	0
normal	19	100

Die Spezifität beträgt > 99,9% bei IgG.

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden Liquor-Serumpaare von gesicherten Neuroborreliosen, Liquor-Serumpaare mit Verdacht auf Neuroborreliose und definierte ZNS-negative Liquor-Serumpaare im VIROTECH Borrelia + VIsE IgG ELISA und in einem Referenztest getestet.

Sensitivität und Spezifität IgG

Liquor/Serumpaare (n=59)

VIROTECH ELISA	Referenztest	
	pathologisch	normal
pathologisch	26	3
normal	0	30

Im IgG beträgt die Sensitivität für den VIROTECH Borrelia + VIsE IgG ELISA > 99,9% und die Spezifität 90,6%.

11.2 Kreuzreaktivität

Im Liquor und Serum befinden sich die gleichen Antikörper (22). Insofern können bei der serologischen Diagnostik, wie bei der Liquordiagnostik, Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen dieselben Krankheitserreger auftreten. Aus diesem Grund sind die Daten aus der Serologie für die Liquordiagnostik übertragbar.

12. Literatur

1. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
2. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
3. 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.
4. Hofmann, H. (1996) Lyme Borreliosis – Problems of Serological Diagnosis, Infection 24, No. 6 :470-472.
5. Pfister, H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
6. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54.
7. Hansen, K. (1993), Laboratory Diagnostic Methods in Lyme Borreliosis, Elsevier Science Publishing Co., Inc.:12.
8. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelioseninfektion, Clin.Lab. 44: 897-902.
9. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Evaluation of Fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis, Eur.J. Microbiol.Infect.Dis 18: 551-560.
10. Craft, J.E., Fischer, D.K., Shimamoto, G.T. and Steere, A.C. (1986), Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G late in the illness., J. Clin. Invest. 78:934-39.
11. Craft, J.E., Grodzicki, R.L. and Steere, A.C. (1984), Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests, J. Inf. Dis. 149:789-95.
12. Goosens, H.A.T., Bogaard, van den A.E., Nohlmans, M.K.E., (1999), Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus Infections cause false positive results in IgM two-test protocol for early Lyme-Borreliosis, Infection 27 No.3: 231.
13. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130.
14. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
15. Oschmann und Kraiczy (1998) Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis, UNI-MED-Verlag 48-67.
16. Wilske et al. MiQ12/2000; Urban&Fischer
17. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease *Borrelia* by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
18. Lawrenz, M.B. et al.; Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*; American Society of Clinical Microbiology; Dec. 1999: 3997-4004.
19. Wang, D., Botkin, D.J. and Norris, S.J.; Characterization of the vls antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI (2003); Molecular Microbiology; 47(5): 1407-1417.
20. Felgenhauer K, Beuche W: Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen; Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1999
21. Reiber H., und Lange P. (1991) Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain, Clin Chem 37: 1153-60
22. Reiber, H. und Peter J. B. (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs, Journal of the Neurological Sciences 184: 101-122.
23. Estimates for Lyme borreliosis infections based on models using sentinel canine and human seroprevalence data. M.J. Cook and B.K. Puri (2020). Infectious Disease Modelling 5 (2020) 871-888. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2020.10.004>.

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

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

▼ **IgG-Proben – Verdünnung**
1:101

z.B.:

10 µl Serum/Plasma + 1000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

Testdurchführung

Probeninkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Patientenproben Leerwert (Verdünnungspuffer) und Kontrollen
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Konjugatinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Konjugat IgG
↓		
4 x Waschen		400 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)