VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot

(Borrelia EU IgG LINE-32; Borrelia EU IgG LINE-96)

Bestell-Nr.: WE224G32; WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

(Borrelia EU IgM LINE-32; Borrelia EU IgM LINE-96)

Bestell-Nr.: WE224M32; WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

(Borrelia EU + Tpn17 IgG LINE-32; Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-96)

Bestell-Nr.: WE225G32; WE225G96

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

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

CE

Freigabedatum: 18.09.2024 11:27
REV 20 / VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot DE

Inhalt

1. Verwendungszweck 3
2. Diagnostische Bedeutung 3
3. Testprinzip 3
4. Packungsinhalt 4
4.1 Kit für 32 Bestimmungen 4
4.2 Kit für 96 Bestimmungen 4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der Reagenzien 4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert) 5
8. Untersuchungsmaterial 5
9. Testdurchführung 5
9.1 Vorbereitung der Proben 5
9.2 Vorbereitung der Reagenzien 6
9.3 Immunoblot Testdurchführung 6
9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren 7
10. Testauswertung 7
10.1 Auswertung der Patientenproben 7
10.2 Einsatz der Cut off Kontrolle 7
10.3 Bedeutung der Antigene 7
10.4 Auswertungskriterien 10
10.5 Grenzen des Tests 11
11. Leistungsdaten 12
11.1 Sensitivität 12
11.2 Spezifität 12
11.3 Diagnostische Sensitivität 12
11.4 Diagnostische Sensitivität IgG + IgM Gesamt 12
11.5 Kreuzreaktivität 13
11.6 Durchseuchungsrate (Erwartete Werte) 13
11.7 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit) 13
11.8 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit) 13
12. Zusätzliche Leistungsdaten für die TpN17 Bande des WE225G32/G96 13
12.1 Diagnostische Sensitivität 13
12.2 Diagnostische Spezifität 13
12.3 Kreuzreaktivität 13
13. Literatur 14
14. Symbole 17
15. Testablaufschema 18

1. Verwendungszweck

LINE Immunoblot Testkit zum qualitativen Nachweis von *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* sensu lato spezifischen IgG- bzw. IgM- Antikörpern im Humanserum.
Neben der Verwendung in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose ist der IgG Line Immunoblot für den Einsatz in der Liquordiagnostik der Neuroborreliose geeignet. Für die Verwendung in der Liquordiagnostik bitte separate Arbeitsanleitung anfordern.

2. Diagnostische Bedeutung

Die Lyme-Borreliose ist eine systemische Erkrankung, die durch eine Infektion mit der Spirochäte *B. burgdorferi* hervorgerufen wird (40, 41). Die Übertragung der Spirochäte auf den Menschen erfolgt durch den Stich einer infizierten Zecke. In Europa wurde die Zecke *Ixodes ricinus* als der Hauptvektor (25) identifiziert. Momentan sind für Europa folgende humanpathogene *B. burgdorferi* Species beschrieben, die unter dem Begriff *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) zusammengefaßt werden: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis* (23, 25, 27, 45, 53, 65).
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 (25). 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 (33).

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 (20).
- die Bildung von IgM-Antikörper kann ganz ausbleiben.
- IgM-Antikörper können über viele Monate persisitieren (21, 36).
- IgG-Antikörper können auch Jahre nach einer klinischen Remission noch nachweisbar sein (21, 36).
- es wurden Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen beobachtet (34, 35). Eine wichtige Rolle nehmen dabei bakteriell bedingte Erkrankungen wie Syphilis sowie Herpes-Virus-Infektionen (insbesondere EBV) ein (39). Falsch positive Antikörperantworten können auch bei Vorhandensein von Autoimmun-Antikörpern auftreten (34).

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 (20).

Es wird empfohlen (nach MIQ 12/2000 und DIN 58969-44 Juli 2005), die Lyme-Borreliose-Serologie in zwei Stufen durchzuführen (7, 73). 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 Immunoblot/Western Blot) weiter untersucht. Die Analyse im Line Immunoblot/Western Blot ermöglicht die spezifische Analyse der - gegen einzelne Erregerantigene gerichteten – Antikörperantwort.

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 Humanserum/-plasma-Proben erlaubt den Nachweis vorhandener spezifischer Antikörper. Diese Antikörper bilden Immunkomplexe mit dem auf den Teststreifen fixierten Antigenen. Nach Entfernung der nicht gebundenen Antikörper durch Waschschritte, werden die einzelnen Nitrozellulosestreifen mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-human IgG- bzw. IgM- Antikörpern inkubiert. Nachdem nicht gebundene konjugierte Antikörper durch einen weiteren Waschschritt entfernt wurden, erfolgt die Sichtbarmachung der Antigen/Antikörper-Komplexe (der gebundenen Antikörper) durch die Zugabe eines ungefärbten Substrates, welches bei seiner enzymatischen Umsetzung blauviolette Banden (“Antigen-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- bzw. IgM-Antikörpern schließen.

4. Packungsinhalt

4.1 Kit für 32 Bestimmungen

1.	**IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen** mit aufgetragenen Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	**1x**	32 Streifen
2.	**IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle**, Humanserum, vorverdünnt	**1x**	1,0 ml
3.	**Verdünnungs-/Waschpuffer**, pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	**2x**	50 ml
4.	**IgG- bzw. IgM- Konjugat** (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	**1x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	**1x**	57 ml
6.	**Auswertungsprotokollblatt** zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	**1x**	1 Stk.

4.2 Kit für 96 Bestimmungen

1.	**IgG bzw. IgM Nitrozellulose Teststreifen** mit aufgetragenen Antigenen, folienverstärkt, sortiert im Heftchen, gebrauchsfertig	**3x**	32 Streifen
2.	**IgG bzw. IgM Cut off Kontrolle**, Humanserum, vorverdünnt	**2x**	1,0 ml
3.	**Verdünnungs-/Waschpuffer**, pH 7,3 (10x konz.), mit Tris und Konservierungsmittel	**4x**	50 ml
4.	**IgG- bzw. IgM- Konjugat** (100x konz.) Anti-Human, (Ziege)-Alkalische Phosphatase, mit Konservierungsmittel	**3x**	0,7 ml
5.	**Substrat** (BCIP/NBT), gebrauchsfertig	**3x**	57 ml
6.	**Auswertungsprotokollblatt** zum Protokollieren und Archivieren der Ergebnisse	**3x**	1 Stk.

Auf Anfrage zusätzlich erhältlich:

Borrelia EU IgG LINE Ctrl-Set	WN224K60
Borrelia EU IgM LINE Ctrl-Set	WN224K80
Borrelia EU + TpN17 IgG LINE Ctrl-Set	WN225K60

IgG bzw. IgM	gebrauchsfertige Kontrollen	Abkürzung
1,0 ml IgG, bzw. 1,0 ml IgM	neg. Ctrl. / negative Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	**NEG**
1,0 ml IgG, bzw. 1,0 ml IgM	Cut off Ctrl. / Cut off Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	**CO**
1,0 ml IgG, bzw. 1,0 ml IgM	pos. Ctrl. / positive Kontrolle, Humanserum/-plasma mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig	**POS**

Die positiven Banden > Cut off Bande können sie dem mitgelieferten Zertifikat entnehmen.
Die negative Kontrolle zeigt keine Banden bzw. keine für die Auswertung relevanten Banden > Cut off Bande.

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 Qualitätskontrollzertifikat.

1. Die einzelnen Reagenzien nicht einfrieren und keinen hohen Temperaturen aussetzen.
2. Reagenzien nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
3. Lagerung der Reagenzien bei grellem Licht ist zu vermeiden.
4. Die BCIP/ NBT-Substratlösung ist lichtempfindlich und muss im Dunkeln aufbewahrt werden.
5. **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	Haltbarkeit
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
Waschlösung	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. 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 Kontrollseren, Proben, verdünnte Proben, Konjugate und die Nitrozellulose Teststreifen 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 Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.
4. 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 (bei Bedarf erhältlich unter Best.-Nr. WE300.08)
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. Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzien nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Packungsbeilage nur Serum erwähnt ist. Für die Verwendung von Liquor, siehe bitte separate Liquor LINE Gebrauchsanleitung.

9. Testdurchführung

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

9.1 Vorbereitung der Proben

1. Pro Patientenprobe werden 15 µl Serum oder Plasma benötigt. Bei der **Liquor/Serumabarbeitung** ist nur die gesonderte, individuell berechnete Liquor-/ Serumverdünnung je Ig- Klasse einzusetzen (siehe Liquor LINE Gebrauchsanleitung).

2. Blutproben sollten aseptisch durch Venenpunktion entnommen werden. Nach vollständiger Gerinnung ist das Serum abzutrennen (entfällt bei Plasma). Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren bei -20°C eingefroren werden.
3. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Seren ist zu vermeiden.
4. Seren, die hitzeinaktiviert, lipämisch, hämolytisch oder mikrobiell kontaminiert sind, können zu verfälschten Ergebnissen führen und sollten daher nicht verwendet werden.
5. Getrübte Serumproben (insbesondere nach dem Auftauen) nicht verwenden, ggf. zentrifugieren (5 min bei 1000 x g), klaren Überstand pipettieren und im Test einsetzen.

9.2 Vorbereitung der Reagenzien

1. Zur Anpassung an die Laborroutine, können alle LINEs und EcoBlots in einem Testlauf mit gleichen Inkubationszeiten und parameter- / chargenübergreifenden Komponenten abgearbeitet werden. Die Cut off Kontrollen werden parameter- und chargenspezifisch eingesetzt.
2. Vor Verdünnung aller Testreagenzien das jeweilige Konzentrat auf Raumtemperatur bringen. Nur Aqua dest./deionisiert von hoher Qualität und Raumtemperatur verwenden.
3. Verdünnungen vor Testansatz gut durchmischen.
4. **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.
5. **IgG bzw. -IgM-Konjugat**
   Das Konjugat 1 + 100 mit endverdünntem Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnen, gut mischen. Pro Serumprobe wird 1,5ml Konjugat-Gebrauchslösung benötigt. Siehe Konjugatverdünnungstabelle (Punkt: „Testablaufschema“).
6. **Substratlösung**
   Die Substratlösung wird gebrauchsfertig geliefert.

9.3 Immunoblot Testdurchführung

Achtung: Die Nitrozellulose Teststreifen dürfen nur in der freigegebenen Ig-Klasse getestet werden (siehe Etikett auf dem Blotheftchen und Bezeichnung auf jedem einzelnen Teststreifen).

Für die korrekte Durchführung und Beurteilung der Borrelia Europe LINEs, muß bei jedem Testansatz eine parameter- und chargenspezifische Cut off Kontrolle mitgeführt werden.

Für eine sichere Borrelien Diagnostik sollte der Borrelia Europe LINE im IgG und IgM durchgeführt 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 Patientenserum/-plasma** bzw**. 100µl der Cut off / Positiven / Negativen Kontrolle** zupipettieren, möglichst am oberen, markierten Streifenende. Patientenserum 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. Streifen **Waschen**: 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. Streifen **Waschen**: 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 hochspezifischen Banden auf dem Protokollblatt erleichtern Ihnen die Auswertung der Patientenproben.

Testablaufschema siehe letzte Seite

9.4 Einsatz von Immunoblot-Prozessoren

Für die automatisierte Abarbeitung der Blots und LINEs sind folgende Geräte validiert: Apollo und Profiblot. Grundsätzlich sind alle handelsüblichen Blotautomaten geeignet.

10. Testauswertung

Zur sicheren Auswertung ist jeder LINE Streifen mit zwei Kontrollen ausgestattet:

1. **Serumkontrolle** (= serum control)**:**
   Nur nach Inkubation mit Patientenserum erscheint unterhalb der Markierungslinie (= markline) die Seruminkubationsbande.
2. **Konjugatkontrolle** (= conjugate control)**:**
   Der LINE Streifen ist mit einer Konjugatkontrollbande ausgestattet, die nach Inkubation mit dem entsprechenden Konjugat erscheint.

Die Testdurchführung ist gültig, wenn auf dem entwickelten Nitrozellulose Teststreifen sowohl die Serumkontrolle als auch die interne Konjugatkontrolle deutlich zu erkennen ist.
Die Position der Serum- / und der Konjugatkontrollbande entnehmen Sie dem Protokollblatt.

10.1 Auswertung der Patientenproben

Die Position und Bezeichnung der reaktiven Banden entnehmen Sie dem Protokollblatt.
IgM-Banden: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix und eine EBV-Bande zur Ausschlussdiagnostik
IgG-Banden: OspC, VlsE-Mix, p39, DbpA-Mix oder DbpA-PKo, p58, p83 und TpN17-Bande zur Ausschlussdiagnostik (nur bei WE 225G)

10.2 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.
IgM Cut off Bande: OspC
IgG Cut off Bande: VlsE-Mix

10.3 Bedeutung der Antigene

Auflistung der verwendeten hochaufgereinigten und rekombinanten *Borrelia burgdorferi* –Antigene, das EBV-**V**iral **C**apsid **A**ntigen gp125 und das TpN 17 Antigen. Der VlsE-Mix besteht aus zwei rekombinanten Antigenen der Genospezies *Borrelia*

burgdorferi sensu stricto und *Borrelia garinii*. Der DbpA-Mix besteht aus den rekombinanten Genospezies *Borrelia garinii, Borrelia bavariensis, Borrelia spielmanii* und dem hochaufgereinigten *Borrelia afzelii.*

Antigen/ Bezeichnung	**Bedeutung der Antigene**	**Spezifität der Antikörper im LINE**	**Ursprungsstämme/Aufreinigung**
OspC (p23) hochaufgereinigt	**O**uter **s**urface **p**rotein **C**. Plasmid kodiertes Lipoprotein (6, 22, 26, 28). Wichtiger Marker für frühe Lyme-Borreliose-Manifestationen, insbesondere in der IgM-Serologie (1, 4, 8, 9, 15, 22, 28, 29, 31, 32). Biologische Bedeutung: *B. burgdorferi* s. l. benötigt OspC vermutlich für eine erfolgreiche initiale Infektion des Säugetierwirts (48, 63, 70, 71). Die Spirochäten exprimieren OspC während der Blutmahlzeit in der Zecke und der frühen Phase der Infektion des Säugetierwirts (48). Nach der Übertragung der Spirochäte auf den Säuger wird die OspC-Expression wieder herabreguliert. Für eine persistierende Infektion scheint das Lipoprotein nicht notwendig zu sein (48, 63). Tilly et al. vermuten, dass OspC während der frühen Phase der Infektion des Säugetierwirts die Phagozytose der Spirochäten verhindert (64).	Spezifisch (3, 8, 22, 28, 30, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (ursprünglich isoliert von menschlichen Erythema migrans Läsion in Deutschland) / aufgereinigt über präparative SDS-Page
VlsE rekombinant	**V**ariable major protein **l**ike **s**equence **E**. *In vivo*-exprimiertes Lipoprotein, das konservierte – Genospezies-übergreifende – hoch immunogene Epitope aufweist. In der IgM-Serologie werden Reaktivitäten gegen VlsE insbesondere bei Seren von Patienten mit frühen Lyme-Borreliosen beobachtet. In der IgG-Serologie werden Reaktivitäten gegen VlsE bei Seren von Patienten mit frühen und fortgeschrittenen Lyme-Borreliosen beobachtet. VlsE fungiert in der IgG-Serologie als Erkrankungsstadium-übergreifender Lyme-Borreliose Marker. VlsE ist ein 35 kDa-Antigen, dass auf lp28-1 kodiert ist (2). 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 (42, 44, 56).	Spezifisch	*B. burgdorferi* B31 (ursprünglich von einer infizierten Zecke auf Shelter Island, N. Y. isoliert*), B. garinii* IP90 (ursprünglich von einer infizierten Zecke in Russland isoliert) / Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie
p39 (BmpA) rekombinant	**B**orrelial **m**embrane **p**rotein **A**. Chromosomal kodierter (6, 19), zentraler Marker in der IgG-Serologie für disseminierte Lyme-Borreliose Infektionen (4, 8, 18). Die Bmp-Proteine sind Lipoproteine mit unbekannter Funktion (43, 57, 62).	Hochspezifisch (4, 5, 6, 8, 14, 15, 18, 31, 32)	*B. afzelii* PKo (ursprünglich isoliert von menschlichen Erythema migrans Läsion in Deutschland)/ Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

DbpA Hochaufgereingt (DbpA Pko)/ rekombinant (DbpA PBi, PBr, A14 S)	**D**ecorin **b**inding **p**rotein **A** (auch Outer surface protein 17 oder p17). Plasmidkodiertes Lipoprotein. Die DbpAs aus verschiedenen Isolaten der humanpathogenen 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 (47, 60, 61, 69). Sie sind Marker der IgM- und IgG-Serologie, vor allem für Neuroborreliosen und Lyme Arthritiden (50, 52, 57, 58, 59, 60). Biologische Bedeutung: Die mikrobielle Adhäsion an Wirtsgewebe stellt einen frühen, kritischen Schritt in der Pathogenese der meisten Infektionskrankheiten dar. Die verschiedenen Borrelien-Spezies exprimieren zwei an der Oberfläche exprimierte Decorin-bindende Adhäsine, DbpA und B, welche die Bindung der Spirochäten an die extrazelluläre Matrix des Wirts vermitteln. Die Borrelien gelangen im Speichel der Zecke in die Dermis und binden dort an Kollagenfasern, bzw. über die Decorin-bindenden Adhäsine A und B an das kollagen-assoziierte Proteoglycan Decorin (46, 49, 72).	Hochspezifisch	*B. bavariensis* PBi und *B. garinii* PBr (Ursprünglich isoliert aus Cerebrospinalflüssigkeit eines Neuroborreliose Patienten in Deutschland), *B. spielmanii* A14S(ursprünglich isoliert von Erythema migrans Läsion in den Niederlanden)/ Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie *B: afzelii* PKo (ursprünglich isoliert von menschlichen Erythema migrans Läsion in Deutschland)/ gereinigt über präparative SDS-Page
p58 (OppA-2) rekombinant	**O**ligopeptide **p**ermease **p**rotein **A**-2 (OppA-2). Chromosomal kodiertes Lipoprotein, welches zwischen den Spezies konserviert ist (54). Wichtiger Marker in der IgG-Serologie für fortgeschrittene Lyme-Borreliosen (47, 51, 57, 67, 68). Biologische Bedeutung: OppA ist ein Membrantransporter, der möglicherweise eine Rolle in der Anpassung *von B. burgdorferi* s. l. an die Wirtsumgebung spielt (55, 66).	Hochspezifisch	*B. bavariensis* PBi (Ursprünglich isoliert aus Cerebrospinalflüssigkeit eines Neuroborreliose Patienten in Deutschland) Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie
p83/100 rekombinant	Chromosomal kodiertes, Protoplasmazylinder-assoziiertes Antigen (12, 13), konserviert innerhalb *von B. burgdorferi* sensu lato (17). Zentraler Marker in der IgG-Serologie für fortgeschrittene Lyme-Borreliosen (8, 24, 29).	Hochspezifisch (3, 5, 8, 22, 24, 29, 31)	*B. afzelii* PKo (ursprünglich isoliert von menschlichen Erythema migrans Läsion in Deutschland)/ Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie
EBV VCA-gp125 affinitätsgereinigt	Immundominasntes Epstein Barr “**V**irus **C**apsid **A**ntigen”. IgM Antikörper gegen VCA-gp125 verschwinden i.d.R. einige Wochen nach der EBV-Infektion wieder.	Hochspezifischer Marker in der IgM-Serologie für eine EBV-Primärinfektion	Aufreinigung von gp125 erfolgt aus Ganzzellysat (EBV infizierte humane Zellen) mittels Äffinitätschromatographie unter Nutzung eines monoklonalen anti-gp125 Antikörpers

Treponema pallidum TpN17 rekombinant (nur bei WE225G)	Marker für eine primäre, sekundäre und latente Syphilis	hochspezifisch für alle Infektionsstadien	*Treponema pallidum*/ Gereinigt aus *E. coli* über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

10.4 Auswertungskriterien

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

Es werden nur Banden als positiv bewertet, die eine Intensität ≥ der cut off Bande zeigen.

Empfohlene IgM Beurteilung[1]

Aufgetretene Bande(n)	**Beurteilung**
Auftreten von ≥ 2 Banden der folgenden: p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix **oder** isolierte OspC (p23)	**Positiv**
Nur eine Bande von: p39 (BmpA), DbpA-Mix, VlsE-Mix	**Grenzwertig**
Keine der folgenden Banden ≥ Cut off Bande: p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix, VlsE-Mix	**Negativ**

Empfohlene IgG Berurteilung[1]

Aufgetretene Bande(n)	**Beurteilung**
Auftreten von ≥ 2 Banden der folgenden: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix **und/oder** DbpA-PKo, VlsE-Mix	**Positiv**
Nur eine Bande von: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix **und/oder** DbpA-PKo, VlsE-Mix	**Grenzwertig**
Keine der folgenden Banden ≥ Cut off Bande: p83/100, p58 (OppA-2), p39 (BmpA), OspC (p23), DbpA-Mix **und/oder** DbpA-PKo, VlsE-Mix	**Negativ**

*** Beide DbpA Banden (Mix und PKo) werden im IgG gemeinsam wie 1 Bande beurteilt**

[1] nach MIQ 12/2000 und DIN 58969-44 Juli 2005 [7,73]

Empfohlene Berurteilung bei positivem VCA-gp125 in der IgM-Serologie

Im Rahmen einer EBV-Primärinfektion kann es aufgrund der polyklonalen B-Zellstimulation zu Antikörpereaktivitäten gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Antigene kommen. Daraus kann ein falsch-positiver Lyme-Borreliose-Befund resultieren. Um derartige Falschdiagnosen zu minimieren, enthält der VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot das Epstein Barr **V**iral **C**apsid **A**ntigen gp125. Reagieren neben gp125 auch gleichzeitig Borrelienantigene (im IgM und/oder IgG) mit einer Intensität ≥ der IgM cut-off-Bande, sollte zur Sicherheit der komplette EBV-Status des Serums überprüft werden (z.B. mit dem VIROTECH EBV IgG LINE Immunoblot; Best.-Nr.: WE102G32/96 und VIROTECH EBV IgM LINE Immunoblot Best.-Nr.: WE102M32/96).

Empfohlene Beurteilung der TpN17-Bande

Die *Treponema pallidum* **TpN17-Antigenbande (nur bei WE225G)**

Bei der Lyme-Borreliose-Serodiagnostik werden Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen beobachtet. Eine wichtige Rolle nehmen dabei Herpes-Virus-Infektionen (insbesondere EBV) sowie bakteriell bedingte Erkrankungen wie die Syphilis ein. Die Lyme-Borreliose MiQ12/2000 empfiehlt: „Bei grenzwertigen oder positivem Suchtest (Anmerkung: der Lyme-Borreliose Serologie) soll ein Lues-Suchtest (z.B. TPHA) durchgeführt werden, um falsch-positive Befunde aufgrund kreuzreagierender Antikörper gegen Treponemen auszuschließen."

Die TpN17-Bande dient der Erkennung falsch grenzwertiger/positiver Ergebnisse in der Lyme-Borreliose-Serodiagnostik durch kreuzreagierende Antikörper aufgrund einer *Treponema pallidum*-Infektion (Syphilis).

Reagiert beim VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot die TpN17-Bande ≥ der IgG cut-off-Bande und gleichzeitig Borrelienantigene im IgM und/oder im IgG , sollte zur Sicherheit der komplette Syphilis-Status des Serums überprüft werden (z.B. mit dem VIROTECH Treponema pallidum IgG LINE Immunoblot und VIROTECH Treponema pallidum IgM LINE Immunoblot WE150).

Unbedingt beachtet werden muß:

a. Die TpN-17-Bande kann hinsichtlich Sensitivität und Spezifität eine komplette Syphilis-Differenzialdiagnose nicht ersetzen.
b. Eine negative TpN17-Antigenbande schließt nicht grundsätzlich die Möglichkeit des Vorhandenseins von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* aus.
c. Ein positives Ergebnis der TpN17-Antigenbande muss durch geeignete *Treponema pallidum*-Bestätigungstests (z.B.: VIROTECH WE150) abgesichert werden.
d. die TpN-17-Bande ist nicht für eine Anwendung in der Liquordiagnostik validiert.

10.5 Grenzen des Tests

1. Ein negatives Blotergebnis schließt die Möglichkeit einer Borrelia-Infektion nicht vollständig aus. Die Probe kann vor Auftreten der Antikörper entnommen worden sein oder der Antikörpertiter liegt unter der Nachweisgrenze des Tests.
2. Die Behandlung der Patienten mit Antibiotika im Frühstadium der Erkrankung (35, 37) kann zu einer Unterdrückung der Immunantwort führen, so dass keine anti-*B. burgdorferi*-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden können.
3. Die Kreuzreaktion zwischen *Borrelia* und anderen Spirochäten kann zu einem Auftreten von Borrelien assoziierten Banden führen, was ein falsch positives Ergebnis zur Folge haben kann. Seren von Patienten mit z.B. folgenden Infektionen können kreuzreagieren: Syphilis (*Treponema pallidum*), Frambösie (*Treponema pertenue*), Rückfallfieber (*Borrelia* spez.), Leptospirosen (*Leptospiren* spez.) (38). Ebenso kann es bei Herpes-Viren (HSV, CMV) und Parvovirus zu Kreuzreaktionen kommen (34, 39). Zeigen sich beim VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot (WE225G) neben Reaktivitäten gegen Lyme-Borreliose-Antigene auch eine Reaktivität gegen das TpN17-Antigen, sind die unter 9.4 (Empfohlene Beurteilung der TpN17-Bande) genannten Hinweise zu berücksichtigen.
4. Im Rahmen einer EBV-Primärinfektion kann es aufgrund der polyklonalen B-Zellstimulation zu Antikörpereaktivitäten gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Antigene kommen (34, 39). Zeigen sich beim VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot neben Reaktivitäten gegen die Borrelien-Antigene (IgM und/oder IgG) auch eine Reaktivität gegen das EBV-gp125, muss eine Mononukleose differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden.

5. In seltenen Fällen können Patientenseren “inverse”-Banden zeigen (dunkler Hintergrund, weiße Banden); diese sind nicht zu bewerten, d.h. der Immunoblot ist in diesen Fällen nicht auswertbar. Das Serum sollte mittels anderer serologischer Methoden überprüft werden.
6. Siehe auch die aufgeführten Grenzen des Tests unter Punkt 2.:„Diagnostische Bedeutung“.

11. Leistungsdaten

11.1 Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden klinisch charakterisierte Serenkollektive im IgG und IgM getestet, die mit einem anderen LINE als Referenzmethode (Befund) vorbestimmt wurden. Serenkollektive: MEM, EM, ECM (n=26), Neuroborreliose (n=14), ACA-Seren (n=10), Lyme-Arthritis (n=24).

Serenkollektiv (n=74)		**Borrelia Europe LINE IgG + IgM**		
		negativ	grenzwertig	positiv
Befund	negativ	0	0	2
	grenzwertig	0	0	1
	positiv	0	4	67

In Bezug auf den Befund errechnet sich eine Sensitivität von > 99,9%.

11.2 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 60 Blutspenderseren im IgG und IgM getestet, die mit einem anderen Borrelien LINE als Referenzmethode (Befund) vorbestimmt wurden.

Serenkollektiv (n=60)		**Borrelia Europe LINE IgG + IgM**		
		negativ	grenzwertig	positiv
Befund	negativ	48	8	1
	grenzwertig	0	1	0
	positiv	1	0	1

In Bezug auf den Befund errechnet sich eine Spezifität von 98%.

11.3 Diagnostische Sensitivität

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurden klinisch charakterisierte Serenkollektive im IgG und IgM getestet. Serenkollektive: MEM, EM, ECM (n=26), Neuroborreliose (n=14), ACA-Seren (n=10), Lyme-Arthritis (n=24).

	Borrelia Europe LINE IgG Serenkollektiv (n=74)			**Borrelia Europe LINE IgM Serenkollektiv (n=74)**		
	negativ	grenzwertig	positiv	negativ	grenzwertig	positiv
EM, ECM, MEM	5	12	9	1	4	21
Neuroborreliose	0	3	11	5	2	7
ACA, Lyme-Arthritis,	0	0	34	9	3	22

11.4 Diagnostische Sensitivität IgG + IgM Gesamt

Serenkollektiv (n=74)	**Borrelia Europe LINE**		
	negativ	grenzwertig	positiv
EM, ECM, MEM	0	4	22
Neuroborreliose	0	0	14
ACA, Lyme-Arthritis,	0	0	34

11.5 Kreuzreaktivität

Es wurden insgesamt 52 potentiell kreuzreaktive Seren im Vergleich zu einem Borrelien Western Blot getestet. Die Ergebnisse der Gesamtbewertung IgG + IgM sind in der Tabelle dargestellt.

	Borrelien Western Blot			**Borrelia Europe LINE**		
	negativ	grenzwertig	positiv	negativ	grenzwertig	positiv
Autoimmun (n=22)	15	1	6	15	4	3
EBV Primärinfektionen (n=10)	6	3	1	5	5	0
Syphilis (n=20)	6	3	11	9	2	9

11.6 Durchseuchungsrate (Erwartete Werte)

Zur Ermittlung der Durchseuchungsrate wurden im IgG und im IgM jeweils 60 Blutspenderseren getestet. Davon war im IgG kein einziges Serum positiv und im IgM 3,3% positiv.

Serenkollektiv (n=60)	**Borrelia Europe LINE IgG**	**Borrelia Europe LINE IgM**
negativ	56	52
grenzwertig	4	6
positiv	0	2

11.7 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

Für die Ermittlung der Wiederholbarkeit wurden im IgG- und in einem IgM- Versuchsansatz je 30 Blotstreifen einer Nitrozellulosemembran mit einem Serum inkubiert, das bei den Antigenbanden schwache bis starke Reaktionen zeigt.
Die jeweiligen Banden zeigen auf dem gesamten Nitrozellulose-Sheet einheitliche Intensitäten.

11.8 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden je 3 Seren im IgG und IgM getestet (ein negatives Serum, zwei positive Seren). Die Bestimmung erfolgte in 10 verschiedenen Testansätzen von 3 Testpersonen.
In allen Testungen wurden die serologischen Vorgaben genau getroffen.

12. Zusätzliche Leistungsdaten für die TpN17 Bande des WE225G32/G96

12.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurden 64 klinisch charakterisierte Syphilisseren im IgG getestet. Die TpN17 Bande zeigt eine Sensitivität von 93,7%.

Serenkollektiv (n=64)	VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot
negativ	4
grenzwertig	1
positiv	59

12.2 Diagnostische Spezifität

Zur Ermittlung der diagnostischen Spezifität wurden 116 klinisch charakterisierte Lyme-Borrelioseseren im IgG getestet. Die TpN17 Bande zeigt eine Spezifität von >99.9%.

12.3 Kreuzreaktivität

Es wurden insgesamt 79 potentiell kreuzreaktive Seren (EBV Primärinfektionen, Autoimmunseren) und 43 Schwangerenseren im IgG getestet. Die TpN17 Bande zeigt eine Spezifität von >99.9%.

13. Literatur

1. Aguero-Rosenfeld et al., 1993 Serodiagnosis in early Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 31:3090-3095
2. Zhang, J-R. et al.; Antigenic variation in Lyme disease Borrelia by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes; Cell 1997. 89:275-285
3. Bruckbauer et al., 1992 Cross reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis. 11:224-232.
4. Dressler et al., 1993 Western blotting in the seradiagnosis of Lyme disease J. infect Dis. 176:392-400
5. Engstroem et al., 1995 Immunoblot Interpretation criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J. Clin. Microbiol. 33:419-427
6. Fawcett et al., 1993 Detection of antibodys to the recombinant P39 protein of *Borrelia burgdorferi* using enzyme immunoassay and immunoblotting. J. Rheumatol. 20:734-738
7. Wilske et al., 12/2000, Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik für Lyme-Borreliose, pp. 38ff., Urban&Fischer Verlag
8. Hauser et al., 1997 Interpretation criteria for Standardized Western Blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 35:1433-1444
9. Marianne J. Mathiesen et al., 1996 Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*. Med. Microbiol. Immunol. 185:121-129
10. Wallich, R. et al.; Artificial-infection protocols allow immunodetection of novel *Borrelia burgdorferi* antigens suitable as vaccine candidates against Lyme disease; Eur. J. Immunol. 2003. 33:708-719
11. Kraiczy, P. et al.; Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family; Eur. J. Immunol. 2003. 33:697-707
12. LeFebvre et al., 1990 The 83-kilodalton antigen of *Borrelia burgdorferi* which stimulates immunoglobulin M (IgM) and IgG responses in infected hosts is expressed by a chromosomal gene. Clin. Microbiol. 28:1673-1676
13. Luft et al., 1992 The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: an immundominant protoplasma cylinder antigen. Infect. Immun. 60:4309-4321
14. Ma et al., 1992 Serodiagnosis of Lyme borreliosis by Western immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 30:370-376
15. Moskophidis et al., 1995 Wertigkeit des Immunoblots in der Serodiagnostik der Lyme Borreliose. lab. Med. 19:231-237
16. Wallich, R. et al.; Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo; Infection and Immunity 1995 Sept:3327-3335
17. Roessler et al., 1995 Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates Med. Microbiol. Immunol. 184:23-32
18. Roessler et al., 1997 Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Influence of Interspecies varability on Serodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 35:2725-2758
19. Simpson et. al., 1990 reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 28:1329-1337
20. RKI (1999), Ratgeber Infektionskrankheiten, Lyme-Borreliose, Epidemiologisches Bulletin, überarbeitete Auflage
21. 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
22. Wilske et al., 1986 Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 263:92-102
23. Dressler, F. (1994) Lyme borreliosis in European children and adolescents, Clinical and Experimental Rheumatology 12 (Suppl. 10) :49-54
24. Wilske et al., 1988 Immunochemische Analyse der Immunantwort bei Spätmanifestationen der Lyme Borreliose. Zbl. Bakt. Hyg. A 267:549-558
25. Pfister,H-W., Wilske, B. (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects, The Lancet Vol. 343: 1013-1015.
26. Wilske & Preac-Mursic 1993 Microbiological diagnosis of Lyme Borreliose in: Aspects of Lyme borreliosis: Weber, Burgdorferi eds. Springer, Berlin 267-300
27. 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
28. Wilske et al., 1993 Immunological and Molecular Polymorphism of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 61:2182-2191

29. Wilske et al., 1994 Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Microbiol. Immunol. 183:43-59
30. Wilske, 1995 Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. Internist 36:114-119
31. Wilske et al., 1997 *Borrelien*. Diagnostische Bibliothek 48:1-12, Blackwell Verlag
32. Zöller et al., 1991, Validity of Western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis, J. Clin. Microbiol. 29:174-182
33. Oschmann und Kraiczy, (1998), Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis“, UNI-MED-Verlag
34. Horst, H. (1997), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankeit) bei Mensch und Tier, 3., überarbeitete Auflage, Spitta Verlag: 128-130
35. Tewald, F. Braun, R. (1998), Durchführung und Interpretation serologischer Tests bei Verdacht auf Borrelien infektion, Clin. Lab. 44: 897-902
36. 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
37. Shrestha M., R.L. Grodzicki, A.C. Steere (1985) Diagnosing early Lyme disease. Am. J. Med. 78: 235-40
38. Magnarelli, L.A., J.F. Anderson and R.C. Johnson (1987), Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156: 183-88
39. 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
40. Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes S.F. et al. (1982), Lyme disease - a tick -borne spirochetosis?, Science 216:1317-19.
41. Steere, A.C. (1989), Lyme Disease, N. Engl. J. Med. 321:586-96.
42. Bankhead, T., Chaconas, G. (2007) The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens. Mol Microbiol
43. Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Carbonaro, C.A., Wormser, G.P., Aguero-Rosenfeld, M.E., Cabello, F.C. (2005) *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in patients with Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 12: 935-940
44. Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., Stevenson, B. (2006) Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. J Bacteriol 188: 4879-4889
45. 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
46. Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., Leong, J.M. (2003) Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 7307-7312
47. Göttner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 43: 3602-3609
48. Grimm, D., Tilly, K., Byram, R., Stewart, P.E., Krum, J.G., Bueschel, D.M., Schwan, T.G., Policastro, P.F., Elias, A.F., Rosa, P.A. (2004) Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 3142-3147
49. Guo, B.P., Brown, E.L., Dorward, D.W., Rosenberg, L.C., Hook, M. (1998) Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 30: 711-723
50. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1998) Diagnostic value of proteins of three Borrelia species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Clin Diagn Lab Immunol 5: 456-462
51. Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B. (1999) Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. J Clin Microbiol 37: 2241-2247
52. Heikkilä, T., Seppälä, I., Saxen, H., Panelius, J., Yrjänäinen, H., Lahdenne, P. (2002) Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein A. J Clin Microbiol 40: 453-460

53. 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
54. Kornacki, J.A., Oliver, D.B. (1998) Lyme disease-causing Borrelia species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. Infect Immun 66: 4115-4122
55. Medrano, M.S., Ding, Y., Wang, X.G., Lu, P., Coburn, J., Hu, L.T. (2007) Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol 189: 2653-2659
56. Norris, S.J. (2006) Antigenic variation with a twist - the Borrelia story. Mol Microbiol 60: 1319-1322
57. Nowalk, A.J., Gilmore, R.D., Jr., Carroll, J.A. (2006) Serologic proteome analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane-associated proteins. Infect Immun 74: 3864-3873
58. Panelius, J., Lahdenne, P., Saxen, H., Carlsson, S.A., Heikkila, T., Peltomaa, M., Lauhio, A., Seppala, I. (2003) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR6 peptide. J Neurol 250: 1318-1327
59. Panelius, J., Sillanpaa, H., Seppala, I., Sarvas, H., Lahdenne, P. (2007) Antibodies to recombinant decorin-binding proteins A and B in the cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis. Scand J Infect Dis 39: 775-780
60. Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J., Wilske, B. (2003) Significant improvement of the recombinant Borrelia-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. J Clin Microbiol 41: 1299-1303
61. Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., Goettner, G., Rogge, S., Wilske, B. (2006) Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the dbpA gene. Int J Med Microbiol 296 Suppl 40: 250-266
62. Shin, J.J., Bryksin, A.V., Godfrey, H.P., Cabello, F.C. (2004) Localization of BmpA on the exposed outer membrane of *Borrelia burgdorferi* by monospecific anti-recombinant BmpA rabbit antibodies. Infect Immun 72: 2280-2287
63. Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P. (2006) *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. Infect Immun 74: 3554-3564
64. Tilly, K., Bestor, A., Jewett, M.W., Rosa, P. (2007) Rapid clearance of Lyme disease spirochetes lacking OspC from skin. Infect Immun 75: 1517-1519
65. 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
66. Wang, X.G., Kidder, J.M., Scagliotti, J.P., Klempner, M.S., Noring, R., Hu, L.T. (2004) Analysis of differences in the functional properties of the substrate binding proteins of the *Borrelia burgdorferi* oligopeptide permease (Opp) operon. J Bacteriol 186: 51-60
67. Wilske, B., Hauser, U., Lehnert, G., Jauris-Heipke, S. (1998) Genospecies and their influence on immunoblot results. Wien Klin Wochenschr 110: 882-885
68. Wilske, B., Habermann, C., Fingerle, V., Hillenbrand, B., Jauris-Heipke, S., Lehnert, G., Pradel, I., Rossler, D., Schulte-Spechtel, U. (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol (Berl) 188: 139-144
69. Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 49: 13-21
70. Xu, Q., Seemanapalli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2006) Constitutive expression of outer surface protein C diminishes the ability of *Borrelia burgdorferi* to evade specific humoral immunity. Infect Immun 74: 5177-5184
71. Xu, Q., McShan, K., Liang, F.T. (2007a) Identification of an ospC operator critical for immune evasion of *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 64: 220-231
72. Xu, Q., Seemanaplli, S.V., McShan, K., Liang, F.T. (2007b) Increasing the interaction of *Borrelia burgdorferi* with decorin significantly reduces the 50 percent infectious dose and severely impairs dissemination. Infect Immun 75: 4272-4281
73. Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN, DIN 58969-44, Medizinische Mikrobiologie-Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten -Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Juli 2005, Beuth Verlag GmbH.

14. Symbole

Siehe Gebrauchsanweisung!

15. Testablaufschema

Testdurchführung in Kurzform:

Probeninkubation	**30 Minuten**	15 µl Patientenserum/-plasma/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: (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