

recomWell Borrelia IgG

recomWell Borrelia IgM

Enzymimmun-Test mit rekombinant produzierten Antigenen zur Bestimmung von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen **Borrelia burgdorferi sensu stricto**, **B. garinii** und **B. afzelii** in humanem Serum oder Plasma.

1. Allgemeines

Der **recomWell Borrelia** ist ein quantitativer in vitro Test zum Nachweis und zur sicheren Identifizierung von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in humanem Serum oder Plasma. Der **recomWell Borrelia** ist ein Screening-Test nach dem Prinzip eines indirekten Sandwich-ELISAs.

2. *Borrelia burgdorferi* und Lyme Borreliose

Das zur Familie der Spirochaetaceae gehörende Bakterium ***Borrelia burgdorferi*** ist das aetiologische Agens der Lyme Borreliose (1 - 4). Der Erreger wurde 1982 von W. Burgdorfer und A. Barbour entdeckt und charakterisiert (5). Als Überträger werden verschiedene Zecken-Arten der Gattung *Ixodes* genannt. In Europa ist dies die Schildzecke *Ixodes ricinus* (6). Die Lyme Borreliose ist weltweit die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen. In Deutschland tritt die Krankheit in allen Regionen auf und ist nicht wie die Frühsommer-Meningo-Encephalomyelitis (FSME) auf wenige Endemiegebiete beschränkt. Die Durchseuchungsrate von *Ixodes ricinus* mit *Borrelia burgdorferi* liegt in Süddeutschland bei 10 - 15 % (7).

Die Lyme Borreliose wurde 1977 von A. Steere in den USA beschrieben (8). Schon früher gab es in Europa Berichte, die verschiedene Manifestationen der Lyme Borreliose nannten. Von Afzelius in Schweden (9) und Lipschütz in Österreich (10) wurde eine krankhafte Veränderung der Haut - Erythema migrans (EM) - beschrieben, die mit einem Zeckenbiss in Verbindung gebracht werden konnte. Eine weitere Hautkrankheit - Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) - wurde von Herxheimer und Hartmann (11) charakterisiert. Garin und Bujadoux (12) in Frankreich und Bannwarth (13) schließlich gaben Hinweise auf neurologische Manifestationen der Lyme Borreliose.

Die Lyme Borreliose manifestiert sich in einer Vielzahl klinischer Erscheinungsbilder. Hautläsionen, Störungen der Skelettmuskulatur, neurologische Symptome, Beeinträchtigung des lymphatischen Systems, Herzstörungen, Augenentzündungen, Leber-, Lungen- und Nierenschädigungen und allgemeine konstitutionelle Symptome sind zu nennen (14). Ähnlich wie bei der Syphilis wird die Lyme Borreliose in verschiedene klinische Stadien eingeteilt. Steere schlug drei Stadien vor (15). Das Erythema migrans (EM), eine Hautläsion, die als zirkuläres Exanthem an der Stelle des Zeckenbisses auftritt, ist charakteristisch für das Stadium 1. Es können Störungen des neurologischen Systems (Garin-Bujadoux-Bannwarth Syndrom) und Lähmungserscheinungen (Fazialisparese) folgen (Stadium 2). Die Lyme Arthritis prägt das Stadium 3. Asbrink modifiziert diese Einteilung in frühe Infektion und späte Infektion (16). Die frühe Infektion wird charakterisiert durch das lokalisierte EM. Innerhalb von Tagen oder Wochen folgt bei Nichtbehandlung eine disseminierte Infektion. Periodisch auftretende Symptome verschiedenster Art können innerhalb von Wochen oder Monaten auftreten. Schließlich wird die späte Infektion, die durch Lyme-Arthritis oder auch ACA geprägt sein kann, nach einem oder mehreren Jahren nach erstem Auftreten der Krankheit beobachtet. Ein Patient kann nur eines der Stadien oder alle drei Stadien durchlaufen, die Krankheit kann asymptomatisch bis zu den Stadien 2 und 3 bleiben.

Vor allem die Ähnlichkeit der Lyme Borreliose Manifestationen mit anderen Krankheitsbildern stellt eine große Herausforderung an die Diagnostik dar.

Während in USA fast ausschließlich die Genospezies *B. burgdorferi sensu stricto* mit Lyme Borreliosen assoziiert wird, wurden in Europa als Erreger der Lyme Borreliose bislang drei humanpathogene Genospezies beschrieben: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii* (35).

Darüber hinaus wurde aufgrund von Analysen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern durch Prof. Dr. Bettina Wilske eine weitere Klassifizierung in Serotypen vorgenommen (36).

Dieser, in Europa vorliegenden Heterogenität, kommt bei der Entwicklung diagnostischer Tests eine besondere Bedeutung zu (37).

3. Diagnostik

Die direkte Kultivierung von **Borrelia burgdorferi** (Erregernachweis) bleibt neben der klinischen Diagnose der sicherste Beweis für eine Infektion. Der Erregernachweis aus Patientenmaterial, wie Hautbiopsien, Liquor oder Punktaten, ist besonders im Frühstadium zu empfehlen. Die Anzüchtung gelingt aus Hautproben in 50 - 70 % der Fälle mit Hautmanifestationen, jedoch nur in 3 - 5 % der Fälle mit Neuroborreliose. Die Anzüchtung ist allerdings schwierig und sehr zeitaufwendig und bleibt somit Speziallabors vorbehalten (17 - 19).

Die serologische Untersuchung ist daher die praktikabelste Lösung für das Routinelabor. Der indirekte Immunfluoreszenz-Test (IFT) mit *Treponema phagedenis* vorabsorbierten Seren, der indirekte Hämagglutinationstest (IHA), sowie Enzymimmunoassays (EIA) werden als Suchtests eingesetzt (20 - 23, 25). Bei Verdacht auf eine neurologische Manifestation bleibt der Nachweis intrathekal produzierter Antikörper ein wichtiges diagnostisches Kriterium (24). Der serologische Befund ist abhängig vom Stadium der Erkrankung, der Dauer der Symptome und einer eventuell schon erfolgten Antibiotikatherapie.

Entsprechend der Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (MiQ 12/2000) (43) sowie des Centers for Disease Control (Atlanta, USA) sollte dem serologischen Suchtest – bei positivem oder fraglichem Ergebnis - ein Bestätigungstest folgen. Der Immunoblot wird als Test der 2. Stufe bei grenzwertigem Suchtest zur Klärung des Befundes und bei positivem Suchtest zur Absicherung des Suchtestergebnisses durchgeführt. Er weist gegenüber den genannten immunologischen Verfahren zusätzliche Kriterien hinsichtlich Sensitivität und Spezifität auf und ermöglicht den Nachweis und die Identifizierung von Borrelienantigen-spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern (26, 27).

Die Verwendung unterschiedlicher **Borrelia burgdorferi** Stämme als Antigen kann zu unterschiedlichen EIA-Testergebnissen führen. Im Frühstadium versagen die angeführten Teste oftmals. Ein weiteres Problem bleibt die Kreuzreaktivität mit verschiedenen anderen bakteriellen Erregern, insbesondere mit *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis (27a). Da die Testantigene im allgemeinen aus Lysaten des gesamten Erregers bestehen, werden auch Antikörper gegen sogenannte "common antigens" erfaßt. Dabei handelt es sich um weit verbreitete und in ihrer Sequenz stark konservierte Proteine, wie zum Beispiel den "heat shock" Proteinen.

Eine Möglichkeit, die genannten Einschränkungen zu umgehen, ist die Verwendung von gentechnologisch erzeugten Antigenen, wie sie von MIKROGEN in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bettina Wilske und Prof. V. Preac-Mursic am Max von Pettenkofer-Institut entwickelt wurden (28 - 32).

4. Testprinzip - recomWell Borrelia

Für den **recomWell Borrelia** werden spezifische **Borrelia burgdorferi** Antigene mit Hilfe rekombinanter *E. coli* Zellen hergestellt.

Die Verwendung rekombinanter Proteine bietet als Vorteile gegenüber den herkömmlichen Elisass aus Borrelienlysaten die Möglichkeit des Angebotes von ansonsten unterrepräsentierten Antigenen in ausreichender Menge, sowie zur Kombination von Proteinen von verschiedenen Borrelien-Genospezies. Darüber hinaus wird durch die selektive Auswahl von spezifischen und für die sensitive serologische Diagnostik wichtigen Antigenen der Einfluß von störenden oder kreuzreagierenden Antigenen minimiert (37).

Nur mit dem **recomWell Borrelia** ist es möglich, Antikörper gegen die verschiedenen Genospezies **B. afzelii**, **B. garinii** und **B. burgdorferi sensu stricto** in einem Testsystem zu erfassen.

Verwendet werden, neben dem äußeren Membranprotein OspC (22kD) und einem spezifischen internen Teil des p41 Antigens (Flagellin), die sehr spezifischen **Borrelia burgdorferi** Antigene p100, VlsE und p18 (Decorin binding protein A, Osp17) (38).

OspC, p18 und VlsE sind in vivo-Proteine, die in Kultur nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert werden. Die rekombinante Technik bietet somit die Möglichkeit, diese Antigene in ausreichenden Mengen anzubieten. Gleichzeitig können homologe Proteine von verschiedenen Genospezies in einem Test angeboten werden. Dies kommt hauptsächlich bei sehr heterogenen Proteinen wie dem OspC und dem VlsE zum Tragen.

Bei der Untersuchung von Patientenserum aus unterschiedlichen Krankheitsstadien der Lyme Borreliose wurde gefunden, dass das OspC (22kD) besonders gute Reaktivität mit Seren der beiden ersten Infektionsstadien (EM, Neuroborreliose) zeigt (33). Dieses Protein ist zusammen mit p41

immundominant für die IgM-Antwort. Ist das OspC Antigen ein immundominanter Marker für die frühe Immunantwort, so stellen die Antigene p100 und p18 besonders zuverlässige Marker für die späte IgG-Immunantwort dar (28). Die Antikörperbildung gegen das VlsE ist überwiegend als IgG-Antwort nachweisbar, und zwar häufig schon früher als bei den zuvor genannten typischen IgG-Markern (39 – 42).

5. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 96 Bestimmungen.

Jeder Reagenziensatz enthält:

WASHBUF 10 X	100 ml	Waschpuffer (zehnfach konzentriert) Enthält Phosphat-Puffer, NaCl und Detergenz. Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
DILUBUF	125 ml	Verdünnungspuffer (gebrauchsfertig) Enthält Protein, Detergenz und blauen Farbstoff. Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
SUBS TMB	12 ml	Chromogenes Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, gebrauchsfertig)
SOLN STOP	12 ml	Stopplösung 25% Phosphorsäure
INSTRU	1	Gebrauchsinformation
EVALFORM	1	Auswertebogen
TAPE	2 Stück	Abdeckfolien

5.1. recomWell Borrelia IgG

Jeder Reagenziensatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel rot markiert) beschichtet mit rekombinanten B. Burgdorferi Antigenen im Vakuum-Druckverschußbeutel
CONTROL + IgG	150 µl	Positive Kontrolle (Violette Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL ± IgG	150 µl	Cutoff Kontrolle (Gelbe Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL - IgG	150 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONJ IgG	250 µl	Anti-human IgG Konjugat (101fach konzentriert, Rote Verschußkappe) Konservierungsstoff: Methylisothiazolon, Natriumazid, Chlorazetamid

5.2. recomWell Borrelia IgM

Jeder Reagenssatz enthält zusätzlich zu den unter Punkt 5 aufgeführten Komponenten:

MTP	12 x 8 Kavit.	Mikrotiterplatte (Riegel grün markiert) beschichtet mit rekombinanten B. burgdorferi Antigenen im Vakuum-Druckverschußbeutel
CONTROL + IgM	150 µl	Positive Kontrolle (Schwarze Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL ± IgM	150 µl	Cutoff Kontrolle (Farblose Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONTROL - IgM	150 µl	Negative Kontrolle (Weiß e Verschußkappe) Konservierungsstoffe: Methylisothiazolon und Oxyprion.
CONJ IgM	250 µl	Anti-human IgM Konjugat (101fach konzentriert, Grüne Verschußkappe) Konservierungsstoff: Methylisothiazolon, Natriumazid, Chlorazetamid

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

Deionisiertes Wasser, Teströhrchen, Mikropipetten, Inkubationsschrank 37°C, Mikrotiterplatten-Photometer

7. Hinweise zum Test und den Reagenzien

7.1. Vorsichtsmaßnahmen

- ☞ Für die Herstellung der Kontrollseren wird Blut von Spendern verwendet, bei denen keine Antikörper gegen HIV 1/2, HCV und kein Hepatitis-Bs-Antigen nachgewiesen wurden. Da trotzdem eine Infektion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muß das Produkt mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie eine Patientenprobe.
- ☞ Während des gesamten Testablaufs müssen geeignete Einmalhandschuhe getragen werden.
- ☞ Die Konjugate, die Kontrollen, der Verdünnungspuffer und der Waschpuffer enthalten Konservierungsstoffe. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- ☞ Phosphorsäure ist reizend. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten unbedingt vermeiden.
- ☞ Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben in Berührung kommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens 1 Stunde bei 121°C autoklaviert werden.

7.2. Hinweise zur Handhabung

Die Packungen tragen ein Verfallsdatum, nach dessen Erreichen keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden kann.

Es dürfen nur Einzelreagenzien verwendet werden, deren Chargennummer mit der entsprechenden Chargennummer auf dem Etikett der Kitverpackung übereinstimmt.

Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Bei substantiellen Änderungen am Produkt, bzw. der Anwendungsvorschrift kann die Anwendung außerhalb der von MIKROGEN vorgegebenen Zweckbestimmung liegen.

Automatisierung ist möglich, nähere Informationen erhalten Sie von MIKROGEN.

7.3. Herstellung der Lösungen

Die Nachweisreagenzien reichen für 96 IgG- oder IgM-Bestimmungen. Die unten genannten Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Bearbeitung von einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten. Bei der Verwendung von mehreren Mikrotiterplattenstreifen gleichzeitig müssen die angegebenen Mengen jeweils mit der Anzahl der verwendeten Mikrotiterplattenstreifen multipliziert werden.

Substrat und Stopplösung sind gebrauchsfertig.

7.3.1. Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers

Das Waschpuffer-Konzentrat wird **1 + 9** mit H₂O deion. verdünnt. Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 5 ml Konzentrat mit 45 ml H₂O deion. gemischt.

7.3.2. Herstellung der Konjugatlösung

Pro einem Mikrotiterplattenstreifen mit 8 Kavitäten werden 1 ml Verdünnungspuffer mit je 10 µl anti-human IgG Peroxidase-Konjugat (Rote Verschlusskappe) oder IgM Peroxidase-Konjugat (Grüne Verschlusskappe) in einem sauberen Gefäß versetzt und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**).

7.4. Lagerung und Haltbarkeit

Die Reagenzien vor und nach Gebrauch bei 2°C - 8°C lagern.

Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann auch in größerer Menge hergestellt werden. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann für die Verwendung bei weiteren Testen eine Woche bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die Verdünnung der Proben, der Kontrollen sowie die Konjugatlösung müssen immer frisch zubereitet werden.

8. Probenmaterial

Das Probenmaterial kann Serum oder Plasma sein, das nach Entnahme möglichst rasch vom Blutkuchen getrennt wurde. Hitzeinaktivierte Proben führen zu erhöhten Hintergrundreaktionen, und dürfen daher nicht verwendet werden. Eine mikrobielle Kontamination der Probe ist unbedingt zu vermeiden. Unlösliche Stoffe sind vor der Inkubation durch Zentrifugation aus der Probe zu entfernen.

Achtung!

Sollen die Bestimmungen nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu 2 Wochen bei 2°C - 8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20°C oder tiefer möglich. Ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben wird wegen der Gefahr fehlerhafter Resultate nicht empfohlen.

9. Testdurchführung

9.1. Testvorbereitung

Vor Gebrauch sollen alle Reagenzien etwa 30 Minuten auf Raumtemperatur (18°C - 25°C) gebracht werden. Zur Vermeidung von Kondenswasserbildung in der Mikrotiterplatte muß diese **im verschlossenen Beutel** auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach der Entnahme der benötigten Riegel soll die Platte im Beutel wieder verschlossen werden und in den Kühlschrank gegeben werden.

Vor Gebrauch die Kontrollseren und Patientenseren, sowie die konzentrierten Konjugate gut durchmischen und soweit möglich anschließend kurz abzentrifugieren, um die Flüssigkeit am Boden der Gefäße zu sammeln.

9.2. Vorbereitung der Proben und Kontrollen

In 1 ml Verdünnungspuffer werden jeweils 10 µl Probe bzw. Kontrolle pipettiert und gut gemischt (Verdünnung **1 + 100**). Bei jedem Testansatz müssen eine negative Kontrolle, eine Cutoff Kontrolle und eine Positive Kontrolle mitgeführt werden, die ebenso wie die Patientenproben verdünnt werden.

9.3. Inkubation der Proben

Die Mikrotiterplatte wird dem Druckverschlußbeutel entnommen.

Von den verdünnten Proben und verdünnten Kontrollen werden **100 µl** pro Kavität pipettiert. Dabei wird von der Negativen Kontrolle, der Positiven Kontrolle und den Patientenproben mindestens ein Wert angelegt, während die Cutoff Kontrolle doppelt angelegt werden muß. Vorzugsweise wird je eine Cutoff Kontrolle am Anfang der Serie und am Ende der Serie pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit Abdeckfolie **abgeklebt** und **1 Stunde** bei **37°C** inkubiert.

9.4. Waschen

Die Kavitäten werden vollständig geleert und anschließend **viermal** mit je 300 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer pro Kavität gewaschen. Es wird empfohlen, diesen Schritt mit einem entsprechenden ELISA-Waschgerät durchzuführen. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß der Waschpuffer zwischen den Waschschritten vollständig entfernt wird.

Nach Beenden des letzten Waschschrilles (auch bei Verwendung eines Waschgerätes) die Platte auf einem Papiertuch ausschlagen, um letzte Flüssigkeitsreste in den Kavitäten zu entfernen.

9.5. Inkubation mit Peroxidase-Konjugat

Von der verdünnten Konjugatlösung (s.7.3.2) werden **100 µl** pro Kavität pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird bei manueller Abarbeitung **sorgfältig** mit Abdeckfolie **abgeklebt** und **30 Minuten** bei **37°C** inkubiert.

9.6. Waschen

Die Kavitäten werden geleert und wie unter 9.4 gewaschen.

9.7. Substratreaktion

Die Substratlösung ist gebrauchsfertig.

Es werden **100 µl** pro Kavität pipettiert.

Die Mikrotiterplatte wird **30 Minuten** bei **Raumtemperatur** unter Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung inkubiert. Die Zeit wird ab Pipettieren der ersten Kavität gerechnet.

9.8. Abstoppen der Reaktion

Zum Abstoppen der Reaktion werden **100 µl** Stopplösung pro Kavität pipettiert. Dabei ist dasselbe Pipettierschema wie beim Pipettieren der Substratlösung einzuhalten.

9.9. Messung der Extinktionen

Die Extinktionen der einzelnen Kavitäten werden in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei **450 nm** und der Referenzwellenlänge **650 nm** (620 bis 650 nm zulässig) gemessen. Der Nullabgleich erfolgt gegen Luft. Die Messung muss innerhalb von 60 Minuten nach Abstoppen der Reaktion erfolgen.

10. Kurzanleitung der Testdurchführung

Verdünnungen:

- | | | |
|--|-----------------------------------|--|
| • Verdünnung von Proben und Kontrollen | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Probe bzw. Kontrolle |
| • Konjugatverdünnung: | 1 + 100 mit Verdünnungspuffer | 10 µl + 1 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |
| • Waschpufferverdünnung: | 1 + 9 mit H ₂ O deion. | 5 ml + 45 ml
je Mikrotiterplattenstreifen |

Testschritte:

- | | | |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| • Probeninkubation: | 100 µl pro Kavität | 60 min bei 37°C |
| • Waschschrilt: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Konjugatinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei 37°C |
| • Waschschrilt: | 300 µl pro Kavität | viermal |
| • Substratinkubation: | 100 µl pro Kavität | 30 min bei Raumtemperatur |
| • Abstoppen: | 100 µl pro Kavität | |
| • Photometrieren: | 450 / 650 (620) nm | |

11. Validierung und Auswertung

11.1. Validierung

Cutoff Kontrolle: Von den Extinktionswerten der beiden Cutoffs (am Anfang und am Ende der Serie) wird der Mittelwert gebildet.

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

Die einzelnen Extinktionswerte der Doppelbestimmung der Cutoff Kontrolle weichen nicht mehr als 20% von ihrem Mittelwert ab.

- Extinktion negative Kontrolle $\leq 0,150$
- Extinktion Cutoff Kontrolle $-$ Extinktion negative Kontrolle $\geq 0,050$
($E_{\text{Cutoff}} - E_{\text{neg. Kontr.}} \geq 0,050$)
- Extinktion positive Kontrolle $-$ Extinktion Cutoff Kontrolle $\geq 0,300$
($E_{\text{pos. Kontr.}} - E_{\text{Cutoff}} \geq 0,300$)

11.2. Auswertung

11.2.1. Qualitative Auswertung

Cutoff (Grenzwert): Extinktionsmittelwert der Cutoff Kontrolle

Graubereich: untere Grenze = Cutoff
 obere Grenze = Cutoff + 20% (Cutoff x 1,2)

- Proben mit Extinktionswerten oberhalb des Graubereiches sind als **positiv** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten unterhalb des Graubereiches sind als **negativ** zu betrachten.
- Proben mit Extinktionswerten im Graubereich sind **grenzwertig**. Sie sollten erneut getestet werden. Sind sie nach dem zweiten Test wiederum grenzwertig, empfiehlt es sich, nach einiger Zeit eine weitere Probe zu nehmen und zu testen (vgl. 11.3).

11.2.2. Quantitative Auswertung

Den Extinktionswerten wird mit Hilfe einer Formel die entsprechende Antikörperaktivität in Units pro ml zugeordnet.

$U/ml \text{ Probe} = (\text{Extinktion Probe} / \text{Extinktion Cutoff}) \times 20$

Graubereich: untere Grenze = 20 U/ml
 obere Grenze = 24 U/ml

- $U/ml \text{ Probe} > 24$ **positives** Testergebnis
- $U/ml \text{ Probe} < 20$ **negatives** Testergebnis
- $20 \leq U/ml \text{ Probe} \leq 24$ **grenzwertiges** Testergebnis

11.3. Hinweise zur Interpretation der Testergebnisse

Ein negatives **recomWell Borrelia IgG-** bzw. **IgM-**Testresultat kann eine Infektion mit **Borrelia burgdorferi** nicht ausschließen. Insbesondere in der frühen Infektionsphase können Antikörper noch nicht oder in nicht nachweisbarer Menge vorhanden sein. Antibiotikabehandlung im frühen Stadium kann eine Bildung von nachweisbaren Antikörpern verhindern. Bei klinischem Verdacht auf Lyme Borreliose und negativem bzw. fraglichem Serumbefund sollte nach drei Wochen eine erneute Probenentnahme und Testung erfolgen.

Ein positives Ergebnis im **recomWell Borrelia IgG** bedeutet nicht in jedem Fall, dass eine aktive Lyme Borreliose vorliegt. Da IgG-Antikörper längere Zeit persistieren, können noch Antikörper einer zurückliegenden **Borrelia burgdorferi**-Infektion nachweisbar sein.

Wir empfehlen positive bzw. grenzwertige Ergebnisse im **recomWell Borrelia** in einem Bestätigungstest (z.B. **recomBlot Borrelia_{NB}**) zu untersuchen.

Bei klinischem Verdacht auf Neuroborreliose sollte der Nachweis intrathekal gebildeter Antikörper erbracht werden. Dazu ist es notwendig, Serum-Liquor-Paare parallel in einem quantifizierbaren Test (z.B. **recomWell Borrelia**) zu untersuchen. Anschließend kann - entsprechend der üblichen 2-Stufen-

Serodiagnostik - der Befund mit dem recomBlot Borrelia abgesichert werden. Für diese Untersuchungen können Anleitungen von MIKROGEN bezogen werden (Liquordiagnostik recomWell Borrelia und Liquordiagnostik recomBlot Borrelia). Zur Erleichterung der Berechnungen für die Liquordiagnostik (nach Reiber) kann ein Excelprogramm von MIKROGEN angefordert werden.

Durch die selektive Verwendung der rekombinanten **Borrelia burgdorferi** Antigene ist eine Kreuzreaktion mit Antikörpern, die durch Infektion mit Erregern der Syphilis (*Treponema pallidum*), des Rückfallfiebers (*Borrelia recurrentis*, *Borrelia duttonii*, *Borrelia hermsii*) oder der Leptospirose (*Leptospira* sp.) induziert werden, weitestgehend ausgeschlossen (34). Bei einer aktiven Lues-Infektion bzw. einer Lues-Serumnarbe sind vereinzelt Antikörperaktivitäten gegen das Antigen p41/interner Teil gefunden worden. Eine Lues-Infektion sollte ausgeschlossen werden.

Bei Vorliegen einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber, EBV-Infektion) kann es zu einer polyklonalen Stimulierung von B-Lymphozyten kommen. Dies kann zu unspezifischen Reaktionen beim Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse führen. Es wird empfohlen, bei unklarer Anamnese und Vorliegen einer schwachen IgM-Antwort, eine EBV-Infektion differentialdiagnostisch auszuschließen.

Eine Störung durch das Vorhandensein von Rheumafaktoren im IgM-Test ist nicht zu erwarten. Dies konnte durch eine Studie, in der 109 Rheumafaktor-positive Seren gemessen wurden, gezeigt werden. Durch die unterschiedliche Verwendung von immundominanten Antigenen für den IgG- bzw. IgM-Test kommt es nicht zu einem falsch positiven IgM-Ergebnis bei solchen Seren, die gleichzeitig Rheumafaktoren und einen hohen anti-Borrelia burgdorferi IgG-Titer aufweisen.

Durch die vorliegende unterschiedliche Antigenbeschichtung wird auch eine mögliche Konkurrenz zwischen IgG- und IgM-Antikörpern vermieden. Es sind keine falsch negativen IgM-Resultate bei hochpositiven anti-Borrelia burgdorferi IgG-Seren zu erwarten.

Serologische Testergebnisse sollten immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild gesehen werden. Bei unklaren oder fraglichen serologischen Ergebnissen wird eine erneute Testung im zeitlichen Verlauf der Infektion empfohlen.

12. Klinische Ergebnisse

12.1. Positive Seren

Mit klinisch definierten Seren ergaben sich folgende Ergebnisse:

	Anzahl	IgG positiv/grenzwertig	IgM positiv/grenzwertig	IgG/IgM positiv/grenzwertig
Erythema migrans	57	33 (58 %)	43 (75 %)	48 (84 %)
Neuroborreliose	55	52 (95 %)	45 (82 %)	55 (100 %)
Arthritis	34	34 (100 %)	17 (50 %)	34 (100 %)
Acrodermatitis	16	16 (100 %)	7 (44 %)	16 (100 %)

12.2. Blutspender

Die Seren wurden im Jahr 2003 gesammelt.

n=200	IgG	IgM
negativ	180	182
positiv oder grenzwertig	20	18
bestätigt durch Western-Blot	19	11
Prävalenz	9,5 %	5,5 %
Spezifität	99 %	96 %

12.3. Präzision

	IgG / IgM
Intra-Assay	VK < 7 %
Inter-Assay	VK < 12 %

13. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 3.
Auf Anforderung übersenden wir Ihnen gerne weiterführende Literatur zur Borrelien Diagnostik.

14. Erklärung der Symbole

Die Tabelle mit der Erklärung der Symbole finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation auf Seite 3.

recomWell Borrelia IgG

recomWell Borrelia IgM

Enzyme immunoassay with recombinant antigens for the detection of IgG or IgM antibodies against **Borrelia burgdorferi sensu stricto**, **B. garinii** and **B. afzelii** in human serum or plasma.

1. General Aspects

recomWell Borrelia is a quantitative in vitro test for the detection and safe identification of IgG or IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi* in human serum or plasma. **recomWell Borrelia** is a screening test based on the principle of an indirect sandwich ELISA.

2. *Borrelia burgdorferi* and Lyme Borreliosis

The bacterium ***Borrelia burgdorferi*** belongs to the family Spirochaetaceae and is the etiologic agent of Lyme borreliosis (1 - 4). This pathogen was first reported and characterised by W. Burgdorfer and A. Barbour in 1982 (5). It is transmitted by various tick species of the genus *Ixodes*. In Europe, the vector is the tick *Ixodes ricinus* (6). Lyme borreliosis is the most common tickborne infectious disease of human beings in the world. It occurs in all areas of Germany and, unlike the early summer meningoencephalomyelitis, is not restricted to a few endemic regions. In Southern Germany, the rate of infection of *Ixodes ricinus* with *Borrelia burgdorferi* is 10 - 15 % (7).

Lyme borreliosis was described by A. Steere in the United States in 1977 (8). In Europe, various manifestations of Lyme borreliosis had already been mentioned in earlier reports. Afzelius in Sweden (9) and Lipschütz in Austria (10) described a skin lesion - erythema migrans (EM) - which could be associated with a tick bite. Another skin disease - acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) - was characterised by Herxheimer and Hartmann (11). Finally, Garin and Bujadoux (12) in France and Bannwarth (13) provided indications of the neurologic manifestations of Lyme borreliosis.

Lyme borreliosis has a large number of clinical manifestations, which include skin lesions, disorders of the skeletal muscles, neurologic symptoms, impairment of the lymphatic system, cardiac disorders, inflammations of the eye, liver, lung and kidney lesions and general constitutional symptoms (14). Similar to syphilis, Lyme borreliosis progresses through different clinical stages. Steere proposed three stages (15). The skin lesion Erythema migrans (EM) which appears as a circular exanthem at the site of the tick bite is characteristic of stage 1. This can be followed by disorders of the neurologic system (Garin-Bujadoux-Bannwarth syndrome) and paralytic symptoms (facial paresis, stage 2). Lyme arthritis marks stage 3. Asbrink modified this division into early infection and late infection (16). The early infection is characterised by localised EM, which is followed by a disseminated infection within days or weeks if untreated. Symptoms of various kinds can occur periodically within weeks or months. The late infection, which can be marked by Lyme arthritis or even ACA, is finally observed one or several years after the disease first appeared. A patient can go through only one of the stages or all three stages; the disease can remain asymptomatic up to stages 2 and 3.

Above all, the similarity between the manifestations of Lyme borreliosis and other diseases poses a big diagnostic challenge.

Whereas in the US the organism associated with Lyme disease is almost exclusively the genospecies *B. burgdorferi sensu stricto*, three humanopathogenic species have been described in Europe as causative organisms in Lyme disease to date: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* and *B. afzelii* (35).

Further classification into serotypes has also been undertaken on the basis of analyses using monoclonal antibodies by Prof. Dr. B. Wilske (36).

Thus microbiological diagnosis in European patients must consider the heterogeneity of Lyme disease borreliae for development of diagnostic tests (37).

3. Diagnosis

Apart from clinical diagnosis, direct cultivation of ***Borrelia burgdorferi*** (pathogen detection) is the safest proof of infection. Pathogen detection in patient material, such as skin biopsies, liquor or drained fluids, is to be recommended, especially in the early stage. Cultivation from skin samples is successful in 50 - 70 % of cases with skin manifestations, but in only 3 - 5 % of cases with neuroborreliosis. However, cultivation is difficult and very time consuming and, therefore, can be performed only in special laboratories (17-19).

For this reason, serological testing is the most convenient solution for the routine laboratory. The indirect immunofluorescence test (IFT) with *Treponema phagedenis* preabsorbed sera, the indirect hemagglutination test (IHA), and enzyme immunoassays (EIA) are used (20 - 23, 25). If a neurologic manifestation is suspected, the detection of intrathecally produced antibodies remains an important diagnostic criterion (24). The serological result depends on the stage of the disease, duration of symptoms, and a possible previous antibiotic therapy.

According to the recommendations of the German Society for Hygiene and Microbiology (MiQ 12/2000) (43) and of the Center for Disease Control (Atlanta, USA) positive and borderline results of the screening assay should be confirmed by a second assay. The immunoblot is used to resolve borderline screening results or to confirm positive screening results. It exhibits additional criteria with regard to sensitivity and specificity and allows the detection and identification of *Borrelia* antigen specific IgM and IgG antibodies (26, 27).

The use of different strains of ***Borrelia burgdorferi*** as antigen can result in varying EIA results. The tests mentioned above frequently fail in the early stage. Another problem is the cross reactivity with various other bacterial pathogens, especially with *Treponema pallidum* which causes syphilis (27a). Since the test antigens generally consist of lysates of the whole pathogen, antibodies against common antigens are also detected. These are widely distributed proteins that have a highly conserved sequence, e.g., heat shock proteins.

All these limitations can be avoided by the use of antigens produced by genetic engineering, as developed by MIKROGEN in collaboration with Dr. med. habil. B. Wilske and Prof. V. Preac-Mursic at the Max von Pettenkofer Institute (28 - 32).

4. Test Principle - *recomWell Borrelia*

For *recomWell Borrelia*, specific ***Borrelia burgdorferi*** antigens are made with the help of recombinant *E. coli* cells.

Use of recombinant proteins has the advantages over conventional lysate blots that otherwise under-represented antigens can be offered in adequate amount and that protein combinations from different *Borrelia* genospecies can be offered in one test. Also, selection of specific antigens important for the sensitive serological diagnosis minimises the influence of disturbing or cross-reactive antigens (37).

It is only with *recomWell Borrelia* that antibodies against the different genospecies ***B. afzelii***, ***B. garinii*** and ***B. burgdorferi sensu stricto*** can be detected in one test system.

Apart from the outer membrane protein OspC (22 kDa) and a specific internal part of the p41 antigen (flagellin), the very specific ***Borrelia burgdorferi*** antigens p100, VlsE and p18 (Decorin binding protein A, Osp17) (38) are used.

OspC, p18 and VlsE are in vivo proteins that are not expressed in culture, or only in very small amounts. The recombinant technique thus makes it possible to provide these antigens in sufficient amounts. At the same time, homologous proteins from different genospecies can be offered in one test. This applies in particular in the cases of highly heterogeneous proteins such as OspC and VlsE.

In the testing of sera from patients in different stages of Lyme borreliosis, OspC (22 kDa) was found to show especially good reactivity with sera from the early phases of infection (EM and Neuroborreliosis) (33). Together with p41, this protein is immunodominant for the IgM response. In comparison with p41, OspC exhibits a considerably higher specificity. If the OspC antigen is an immunodominant marker for the early immune response, the antigens p100 and p18 are especially reliable markers for the late IgG immune response (28). Production of antibodies to VlsE is mainly detectable as an IgG response, frequently predating the typical IgG markers mentioned above (39 – 42).

5. Package contents

The reagents in one pack are sufficient for 96 determinations.

Each reagent set contains:

WASHBUF 10 X	100 ml	Wash buffer (ten times the concentration) Contains phosphate buffer, NaCl and detergent, Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
DILUBUF	125 ml	Dilution buffer (ready-for-use) Contains protein, detergent and blue dye Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
SUBS TMB	12 ml	Chromogenic substrate tetramethylbenzidine (TMB, ready-for-use)
SOLN STOP	12 ml	Stop solution 25 % Phosphoric acid
INSTRU	1	Instructions for use
EVALFORM	1	Evaluation form
TAPE	2 pieces	Sealing tape

5.1. recomWell Borrelia IgG

Additionally to the components listed under Point 5 each reagent set contains:

MTP	12 x 8 wells	Microplate (section marked in red) coated with recombinant B. burgdorferi antigens in vacuum-pressure sealed bag
CONTROL + IgG	150 µl	Positive control (violet screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONTROL ± IgG	150 µl	Cutoff control (yellow screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONTROL - IgG	150 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONJ IgG	250 µl	Anti-human IgG conjugate (101 times the concentration, red screw cap) Preservatives: methylisothiazolone, sodium azide and chloroacetamide

5.2. recomWell Borrelia IgM

Additionally to the components listed under Point 5 each reagent set contains:

MTP	12 x 8 wells.	Microplate (section marked in green) coated with recombinant B. burgdorferi antigens in vacuum-pressure sealed bag
CONTROL + IgM	150 µl	Positive control (black screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONTROL ± IgM	150 µl	Cutoff control (colourless screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONTROL - IgM	150 µl	Negative control (white screw cap) Preservatives: methylisothiazolone and oxypyrrione
CONJ IgM	250 µl	Anti-human IgM conjugate (101 times the concentration, green screw cap) Preservatives: methylisothiazolone, sodium azide and chloroacetamide

6. Additional reagents and accessory equipment required

Deionised water, test tubes, micro pipettes, incubator 37°C, microplate photometer

7. Information on test and reagents

7.1. Precautions

- ☞ Control sera are from blood donors verified for the absence of antibodies to HIV 1/2, HCV and no Hepatitis Bs-antigen. Since an infection cannot be excluded with absolute certainty despite this precaution, the product must be treated with the same care as the patient sample.
- ☞ Suitable single-use gloves must be worn during the entire test procedure.
- ☞ The conjugates, controls, dilution buffer and wash buffer contain preservative agents. Avoid contact with skin or mucosa.
- ☞ Phosphoric acid is an irritant. Avoid all contact with skin or mucosa.
- ☞ All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least 1 hour.

7.2. Handling information

A quality guarantee can only be given up to the expiry date on the packages.

Only reagents with lot numbers corresponding to the respective lot number on the label of the kit package may be used.

The test must be performed by well-trained and authorised qualified personnel.

In case of substantial modifications of the product or the instructions for use, the application of the test might differ from the purpose intended by MIKROGEN.

Automation is possible, please refer to MIKROGEN for details.

7.3. Preparation of the solutions

The test reagents are sufficient for 96 IgG or IgM tests. The amounts indicated below refer to processing of a microplate strip with 8 wells. If several microplate strips are used at the same time, the amounts indicated must be multiplied by the number of microplate strips used.

Substrate and stop solution are ready to use.

7.3.1. Preparation of ready-to-use wash buffer

The wash buffer concentrate is diluted **1 + 9** with deionised H₂O. 5 ml concentrate are mixed with 45 ml deionised H₂O per microplate strip with 8 wells.

7.3.2. Preparation of conjugate solution

Per each microplate strip with 8 wells, 10 µl anti-human IgG peroxidase conjugate (red cap) or IgM peroxidase conjugate (green cap) are added to 1 ml dilution buffer in a clean vessel and mixed well (dilution **1 + 100**).

7.4. Storage and stability

Store the reagents at **2°C - 8°C** before and after use.

The ready-to-use wash buffer can be prepared in larger amounts. Ready-to-use wash buffer may be stored at room temperature for one week for use in further tests.

The sample dilutions, controls and conjugate solution must always be prepared freshly.

8. Sample material

The sample material can be serum or plasma that is separated from the coagulum as soon as possible after sampling. Heat-inactivated samples will result in raised background reaction levels and are therefore unsuitable for use. A microbial contamination of the sample has to be avoided at all costs. Insoluble substances must be removed from the sample prior to incubation by centrifugation.

Important!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at 2°C - 8°C. Longer storage of the samples is possible at -20°C or below. Repeated freezing and thawing of the samples is not recommended because this may affect the quality of the results.

9. Test procedure

9.1. Test preparations

Temper all reagents to room temperature (18°C - 25°C) before use for about 30 minutes. To avoid condensation of water in the microplate, it must be brought up to room temperature **in the closed bag**. After the required section is removed, the bag containing the plate must be reclosed and placed in the refrigerator.

Before use, the control and patient sera and concentrated conjugates must be mixed well and briefly centrifuged if practicable to collect the liquid at the bottom of the tubes.

9.2. Preparation of samples and controls

Pipette 10 µl of sample or control into 1 ml dilution buffer each and mix well (dilution **1 + 100**). A negative control, cutoff control and positive control must be run parallel to each test run and diluted just like the patient samples.

9.3. Incubation of the samples

The microplate is removed from the pressure-sealed bag.

Pipette **100 µl** per well of the diluted samples and diluted controls. One value is tested for each negative control, positive control and patient sample, whereas the cutoff control must be double-tested. It is preferable to pipette one cutoff control at the beginning and again at the end of the series.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with sealing tape and incubated for **1 hour** at **37°C**.

9.4. Washing procedure

The wells are emptied completely, then washed **four times**, each time with 300 µl ready-to-use wash buffer per well. We recommend performing this step with the appropriate ELISA washing equipment. Make absolutely sure that the wash buffer is removed completely between the washing steps.

After the last washing step is completed (even if washing equipment is being used) tap the plate over a paper towel to remove any residual liquid from the wells.

9.5. Incubation with peroxidase conjugate

Pipette **100 µl** per well.

In manual processing, the microplate is **carefully taped** over with sealing tape and incubated for **30 minutes** at **37°C**.

9.6. Washing procedure

The wells are emptied and washed as described under 9.4.

9.7. Substrate reaction

The substrate solution is ready to use.

Pipette **100 µl** per well.

The microplate is incubated for **30 minutes** at **room temperature** while protecting it from direct sunlight. The time is counted from pipetting of the first well.

9.8. Stopping the reaction

To stop the reaction, pipette **100 µl** of stop solution per well, using the same pipetting scheme as for the substrate solution.

9.9. Measurement of the extinctions

The extinction in the individual wells are measured in a microplate photometer at **450 nm** and at the reference wavelength **650 nm** (620 to 650). Blank on air. Measurement should be performed within 60 minutes after stopping the reaction.

10. Summary of the test procedure

Dilutions:

- Dilution of samples and controls 1 + 100 with dilution buffer 10 µl + 1 ml per sample resp. control
- Conjugate dilution: 1 + 100 with dilution buffer 10 µl + 1 ml per microplate strip
- Wash buffer dilution: 1 + 9 with deionised H₂O 5 ml + 45 ml per microplate strip

Test steps:

- Sample incubation: 100 µl per well 60 min at 37°C
- Washing step: 300 µl per well four times
- Conjugate incubation: 100 µl per well 30 min at 37°C
- Washing step: 300 µl per well four times
- Substrate incubation: 100 µl per well 30 min at room temperature
- Stopping: 100 µl per well
- Photometry: 450 / 650 (620) nm

11. Validation and evaluation

11.1. Validation

Cutoff control: The average value of the extinction values for the two cutoffs (at the beginning and end of the series) is obtained.

The test can be evaluated under the following conditions:

The individual extinction values for double-testing of the cutoff control deviate from their average value not more than 20%.

- Extinction negative control ≤ 0.150
- Extinction cutoff control - Extinction negative control ≥ 0.050
($E_{\text{cutoff}} - E_{\text{neg. contr.}} \geq 0.050$)
- Extinction positive control - Extinction cutoff control ≥ 0.300
($E_{\text{pos. contr.}} - E_{\text{cutoff}} \geq 0.300$)

11.2. Evaluation

11.2.1. Qualitative evaluation

Cutoff (boundary value): Extinction average for cutoff control

Grey range: Lower limit = Cutoff
 Upper limit = Cutoff + 20% (cutoff x 1.2)

- Samples with extinction values above the grey range are to be considered **positive**.
- Samples with extinction values below the grey range are to be considered **negative**.
- Samples with extinction values in the grey range are **borderline** and should be retested. If they are still borderline after the second test, it is recommended that an additional sample should be taken after a period of time and retested (cf. 11.3).

11.2.2. Quantitative evaluation

The antibody activity levels in units per ml are assigned to the extinction values using a formula.

U/ml sample = (extinction sample / extinction cutoff) x 20

Grey range: Lower limit = 20 U/ml
 Upper limit = 24 U/ml

- U/ml sample > 24 **positive** test result
- U/ml sample < 20 **negative** test result
- $20 \leq \text{U/ml sample} \leq 24$ **borderline** test result

11.3. Directions for the Interpretation of Test Results

A negative **recomWell Borrelia IgG or IgM** test result cannot exclude an infection with **Borrelia burgdorferi**. Especially in the early phase of infection, it is possible that antibodies are not yet or not present in detectable amounts. Treatment with antibiotics in the early stage can prevent the formation of detectable antibodies. If Lyme borreliosis is clinically suspected and the serum result is negative or doubtful, sample withdrawal and testing should be repeated after three weeks.

A positive result in **recomWell Borrelia IgG** does not indicate active Lyme borreliosis in every case. Since IgG antibodies persist for a longer time, antibodies from a past infection with *Borrelia burgdorferi* can still be detectable.

We generally recommend to check positive and borderline ELISA results by a confirmation test (for instance recomBlot Borrelia_{NB}).

In case of clinical suspect of Neuroborreliosis the detection of intrathecally produced antibodies represents the most commonly accepted proof.

This requires the parallel examination of serum/cerebrospinal fluid pairs in an quantifiable test. (e.g. *recomWell Borrelia*). According to the two step procedure in serum diagnosis, the achieved positive or borderline test results may be confirmed by the *recomBlot Borrelia*. The corresponding procedure instructions (Liquor Diagnosis *recomWell Borrelia* and Liquor Diagnosis *recomBlot Borrelia*) may be obtained from MIKROGEN. To facilitate the necessary calculations (according to Reiber) MIKROGEN provides an Excel program on demand.

A cross reaction with antibodies induced by infection with the pathogens of syphilis (*Treponema pallidum*), relapsing fever (*Borrelia recurrentis*, *Borrelia duttonii*, *Borrelia hermsii*) or leptospirosis (*Leptospira* sp.) is excluded to the greatest possible extent by the selective use of recombinant **Borrelia burgdorferi** antigens (34). In the case of an active lues infection or a lues serum scar, antibody activities against antigen p41/internal part have been found occasionally. A lues infection should be excluded.

In the presence of infectious mononucleosis (Pfeiffer's disease, EBV infection), polyclonal stimulation of B lymphocytes can occur. This can result in non-specific reactions in the detection of antibodies of the IgM class. If the anamnesis is unclear and the IgM response is weak, it is recommended that an EBV infection be excluded by differential diagnosis.

In the IgM test, interference due to the presence of rheumatoid factors is not to be expected. This could be shown in a study in which 109 sera, all positive for rheumatoid factors, were measured. In sera which simultaneously exhibit rheumatoid factors and a high anti-*Borrelia burgdorferi* IgG titer, an incorrect positive IgM result is not obtained because different immunodominant antigens are used for the IgG and IgM tests.

Possible competition between IgG and IgM antibodies is avoided because of the different antigen coating used. No incorrect negative IgM results are to be expected in the case of highly positive anti-*Borrelia burgdorferi* IgG sera.

Serological test results should always be considered in connection with the clinical picture. If the serological results are unclear or doubtful, it is recommended that the test be repeated later in the course of the infection.

12. Clinical Results

12.1. Positive Sera

Clinically defined sera showed the following results:

	Number	IgG positive/borderline	IgM positive/borderline	IgG/IgM positive/borderline
Erythema migrans	57	33 (58 %)	43 (75 %)	48 (84 %)
Neuroborreliosis	55	52 (95 %)	45 (82 %)	55 (100 %)
Arthritis	34	34 (100 %)	17 (50 %)	34 (100 %)
Acrodermatitis	16	16 (100 %)	7 (44 %)	16 (100 %)

12.2. Blood donors

The sera used were collected in 2003.

n=200	IgG	IgM
negative	180	182
positive or borderline	20	18
defined positive by Western Blot	19	11
Prevalence	9,5 %	5,5 %
Specificity	99 %	96%

12.3. Precision

	IgG / IgM
Intra-Assay	VK < 7 %
Inter-Assay	VK < 12 %





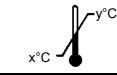
13. Literature

- (1) Steere A.C., Grodzicki R.L., Komblatt A.N., Craft J.E., Barbour A.G., Burgdorfer W., Schmidt G.P., Johnson E., Malawista S.E. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 308, 733 - 740
- (2) Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwaldt A.G., Brenner D.J. (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34, 496 - 497
- (3) Paster B.J., Dewhirst F.E., Weisburg W.G., Tordoff L.A., Fraser G.J., Hespell R.B., Stanton T.B., Zablen L., Mandelco L., Woese C.R. (1991) Phylogenetic Analysis of the Spirochetes. *Journal of Bacteriology* Vol. 173 No. 19, 6101 - 6109
- (4) Benach J.L., Bosler E.M., Hanrahan, J.P., Coleman J.L., Habicht G.S., Bast T.F., Cameron D.J., Ziegler J.L., Barbour A.G., Burgdorfer W., Edelman R., Kaslow R.A. (1983) Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med* 308, 740 - 742.
- (5) Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P. (1982) Lyme disease, a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317 - 1319
- (6) Krampitz H.E. (1986) In vivo isolation and maintenance of some wild strains of European hard tick spirochetes in mammalian and arthropod hosts: a parasitologist's view. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 263, 21 - 28.
- (7) Wilske B., Steinhuber R., Bergmeister H., Fingerle V., Schierz G., Preac-Mursic V., Vanek E., Lorbeer B. (1987) Lyme Borreliose in Süddeutschland. *Dtsch Med Wschr* 112, 1730 - 1736.
- (8) Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R. et al. (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20, 7 - 17
- (9) Afzelius A. (1921) Erythema chronicum migrans. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 2, 120 - 125.
- (10) Lipschütz B. (1923) Weiterer Beitrag zur Kenntnis des "Erythema chronicum migrans". *Arch Dermatol Syph* 143, 365 - 374.
- (11) Herxheimer K., Hartmann K. (1902) Ueber Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol Syph* 61, 57 - 76, 255 - 300.
- (12) Garin M. M. Ch., Bujadoux R. (1922) Paralysie par les tiques. *J Med Lyon* 71, 765 - 767.
- (13) Bannwarth A. (1941) Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und Rheumatismus. *Arch Psychiatr Nervenkr* 113, 284 - 376.
- (14) Steere A.C. (1989) Lyme Disease. *N Engl J Med* 321, No. 9, 586 - 596.
- (15) Steere A.C., Bartenhagen N.H., Craft J.E. et al. (1983) The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 99, 76 - 82.
- (16) Asbrink E., Hovmark A. (1988) Early and late cutaneous manifestations of Ixodes-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme Borreliose). *Ann N Y Acad Sci* 539, 4 - 15.
- (17) Karlson M., Hovind-Hougen K., Svenungsen B., Stiernsted G. (1990) Cultivation and characterization of Spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 28, 473 - 479.
- (18) Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G. (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: Culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 112 - 118.
- (19) Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G., Pfister H.W., Einhäupl K. (1984) Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. *Eur J Clin Microbiol* 3, 564 - 565.
- (20) Stiernstedt G. T., Granström M., Hederstedt B., Sköldenberg B. (1985) Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescent assay in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 21, 819 - 825.
- (21) Steere A.C., Berardi V.P., Weeks K.E., Logigian E.L., Ackermann R. (1990) Evaluation of the intrathecal antibody response to *Borrelia burgdorferi* as a diagnostic test for Lyme Neuroborreliosis. *J Infect Dis* 161, 1203 - 1209.
- (22) Berardi V.P., Weeks K.E., Steere A.C. (1988) Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay. *J Infect Dis* 158, 754 - 760.
- (23) Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Schierz G. (1990) Diagnostik der Lyme Borreliose. *Diagnose und Labor, Laboratoriumsblätter* 40, 24 - 36.
- (24) Wilske B., Bader L., Pfister H.W., Preac-Mursic V. (1991) Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose. *Fortschr. Med.* 109, 22, 441 - 446.
- (25) Hansen K., Hindersson P., Pedersen N.S. (1988) Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J Clin Microbiol* 26, 338 - 346.
- (26) Grodzicki R.L., Steere A.C. (1988) Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J Infect Dis* 157, 790 - 797.
- (27) Bingnan Ma, Christen B., Leung D., Vigo-Pelfrey C. (1992) Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: reactivity of various significant antibodies against *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 30, 370 - 376
- (28) Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Bruckbauer H., Hofmann A., Zumstein G., Jauris S., Soutschek E., Motz M. (1990) Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*: implications for improving serodiagnosis of Lyme borreliosis. In Neu HC (ed) *New Antibacteriological Strategies*. Churchill Livingstone, London, 47 - 63.
- (29) Wilske B., Preac-Mursic V., Fuchs R., Soutschek E. (1991) Immunodominant proteins of *Borrelia burgdorferi*, the etiological agent of Lyme borreliosis. *World J Microbiol Biotech* 7, 130 - 136.
- (30) Fuchs R., Jauris S., Lottspeich F., Preac-Mursic V., Wilske B., Soutschek E. (1992) Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6(4), 503 - 509.
- (31) Wilske B., Barbour A.G., Bergström S., Burman N., Restrepo B.I., Rosa P.A., Schwan T., Soutschek E., Wallich R. (1992) Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp.. *Res Microbiol* 143, 583 - 596.
- (32) Zumstein G., Fuchs R., Hofmann A., Preac-Mursic V., Soutschek E., Wilske B. (1992) Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* 181, 57 - 70.
- (33) Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., von Busch K. (1986) Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 92 - 102.
- (34) Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B. (1992) Cross-reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11, 224 - 232
- (35) Baranton G., Marti Ras N., Postic D. (1998): Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 110, 850 - 855

- (36) Wilske B., Preac-Mursic V., Göbel U. B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. (1993): An OspA Serotyping System for *Borrelia burgdorferi* Based on Reactivity with Monoclonal Antibodies and OspA Sequence Analysis. *J Clin Microbiol* 31, 340 – 350
- (37) Wilske B. (2003): **Review** Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 3, No 4, 215 – 227
- (38) Jauris-Heipke S., Wilske B. et al (1999): Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 187, 213 – 219
- (39) Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B., 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
- (40) Eicken C., Sharma V., Klabunde T., Lawrenz M. B., Hardham J. M., Norris S. J., Sacchetti J. C. (2002): Crystal Structure of Lyme Disease Variable Surface Antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* 277, 21691 – 21696
- (41) Wang D., Botkin D. J., Norris S. J. (2003): Characterisation of the *vls* antigenic variation loci of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia garinii* Ip90 and *Borrelia afzelii* ACAI. *Mol Microbiol* 47(5), 1407 – 1417
- (42) Ohnishi J., Schneider B., Messer W. B., Piesman J., de Silva A. M. (2003): Genetic Variation at the *vlsE* Locus of *Borrelia burgdorferi* within Ticks and Mice over the Course of a Single Transmission Cycle. *Journal of Bacteriology* 185, 4432 – 4441
- (43) MiQ 12/2000 – Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), **Lyme-Borreliose**, Urban & Fischer

We will be pleased to send you further literature on the diagnosis of *Borrelia burgdorferi*.

14. Explanation of the symbols

	Contains sufficient for < n > tests (number of tests)	Inhalt ist ausreichend für < n > Ansätze (Anzahl der Ansätze)
	Consult instructions for use	Gebrauchsinformation beachten
CONT	Contains	Inhalt, enthält
IVD	in vitro diagnostic device	In vitro Test
LOT	Batch code	Chargen-Nummer
	Do not freeze	Nicht einfrieren
REF	Catalogue number	Bestell-Nummer
	Use by expiry date	verwendbar bis Mindesthaltbarkeitsdatum
	Temperature limitation Store between x°C and y°C	Lagerung bei x°C bis y°C

recomWell Borrelia IgG		Artikel-Nr./ Article No.:	4204
recomWell Borrelia IgM		Artikel-Nr./ Article No.:	4205
Gebrauchsinformation/ Instructions for use: GIREBB013ADE.DOC gültig ab/ valid from: Juli/July 2005			
MIKROGEN GmbH Floriansbogen 2-4 D-82061 Neuried Germany www.mikrogen.de	Tel: +49 (0)89 54 80 1-0 Fax: +49 (0)89 54 80 1-100	mikrogen@mikrogen.de	
QM-SYSTEM zertifiziert durch: QM System certified according to:		