

Ida-Marie Tretnes Knutson og Nina Kristine Søybye

## **Serologisk deteksjon av IgM antistoff mot *Borrelia burgdorferi***

*En sammenlikning av VirClia og Line Blot*

### **Serological detection of IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi***

*A comparison of VirClia and Line Blot*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Tove Kristin Ude, Ingvild Haugan og Bente Hagh

Mai 2023



Ida-Marie Tretnes Knutson og Nina Kristine Søybe

# **Serologisk deteksjon av IgM antistoff mot *Borrelia burgdorferi***

*En sammenlikning av VirClia og Line Blot*

Serological detection of IgM antibodies against  
*Borrelia burgdorferi*

*A comparison of VirClia and Line Blot*

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Tove Kristin Ude, Ingvild Haugan og Bente Hagh

Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Fakultet for naturvitenskap

Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Denne rapporten ble skrevet i forbindelse med bacheloroppgave i bioingeniørfag ved NTNU. Oppgaven ble gitt av avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM) ved St. Olavs hospital under vårt siste semester på bioingeniørstudiet. Praktisk arbeid ble utført ved AMM, seksjon for serologi, og hovedsakelig ved bruk av analyseinstrumentet VirClia og manuell metode Line Blot fra recomLine.

Vi ønsker å takke prosessveilederen vår Liv Thommesen, og de faglige veilederne våre Tove Kristin Ude, Ingvild Haugan og Bente Hagh for god hjelp og svar på spørsmål. En spesiell takk til Tove Kristin Ude for alltid å være tilgjengelig på epost. Vi vil også takke avdelingen og de andre ansatte for å ha tatt god imot oss og bidratt til en trivelig bachelorperiode.

## Sammendrag

På St.Olavs Hospital ved enheten for serologi ved avdeling for medisinsk mikrobiologi benyttes per dags dato den manuelle metoden Line Blot fra recomLine. Metoden benyttes for identifisering av IgM antistoff mot bakterien *Borrelia Burgdorferi*. Line Blot krever mye tid og ressurser. Avdelingen ønsker derfor å bytte Line Blot ut med det nye instrumentet VirClia levert av Vircell. For at Line Blot skal kunne byttes ut med VirClia må den nye metoden ikke være mindreverdige nåværende metode. Hensikten med dette bachelorprosjektet er å sammenlikne de to metodene og undersøke avvik i prøveresultat mellom dem.

Totalt 59 prøver ble analysert ved bruk av begge metodene. Vi analyserte fem ulike prøvegrupper for å undersøke VirClia i ulike situasjoner som muligheten for kryssreaktivitet, og falske positive resultater fra screeningmetoden på instrumentet Liaison XL.

I gruppen med positive syfilisprøver for testing av kryssreaktivitet, viser resultatene til at VirClia er mest spesifikk da den ikke ga utslag på noen av prøvene. Likevel viser resultatene fra kontrollprøvene og prøvene som tidligere ble negative på Liaison at VirClia gir et avvik på 12%. De to siste prøvegruppene ga sprikende resultater og diskuteres nærmere under «4.0 Diskusjon».

Det er vanskelig å trekke en konklusjon om Line Blot kan byttes ut med VirClia basert på det begrensede antallet prøver som ble brukt i prosjektet. Med kun 59 prøver totalt og noen prøvegrupper som ikke inneholder flere enn seks prøver, vil ett avvik utgjøre en stor prosentandel. Derfor er ikke resultatene fra dette prosjektet det eneste som bestemmer om byttet skal gjennomføres. Vi ville anbefalt å benytte et større prøvevolum for å få et bedre inntrykk av VirClia i forhold til Line Blot.

## Abstract

The unit of serology in the department for medical microbiology at St.Olavs Hospital are currently using the manual method Line Blot from recomLine for identification of IgM antibodies against *Borrelia*. This method is time consuming, and the department wants to replace it with the new instrument VirClia from Vircell. To replace the current method, the new method has to be not inferior to the old one. The purpose of this Bachelor's thesis is to compare VirClia to Line Blot and investigate discrepancies between these two methods.

A total of 59 samples were analysed using both methods. We analysed five different sample groups to test VirClia in different situations like the possibility of cross reactivity, and false positive test results from the screening method on the instrument Liaison XL.

In the group of positive syphilis samples to test cross reactivity, VirClia proves to be the most correct as it did not detect enough *Borrelia* antibodies to give any positive results. However, in the group of control samples, and the samples that previously tested negative on the screening method, there was a discrepancy of 12%. The two last sample groups gave mixed results and are discussed more closely under the discussion chapter "4.0 Diskusjon".

It is difficult to draw a conclusion on whether VirClia can replace Line Blot based on such a limited number of samples. With only 59 samples in total, and some sample groups containing only six samples, one discrepancy will amount to a relatively large percentage. This is why the numbers in this paper is not the only thing deciding whether or not VirClia replaces Line Blot. We would recommend that more samples should be analysed before drawing a conclusion.

# Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	III
Innholdsfortegnelse.....	IV
1.0.0 Innledning .....	1
1.1.0 Borreliose .....	1
1.1.1 Skogflått.....	1
1.1.2 Symptomer på Borreliose .....	3
1.1.3 Behandling.....	4
1.2.0 <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	5
1.2.1 Morfologi.....	5
1.2.2 Bakteriens genom .....	8
1.2.3 Virulens og etablering av infeksjon.....	8
1.3.0 Påvisning av antistoffer mot <i>Borrelia Burgdorferi</i> .....	9
1.3.1 Diagnostisering.....	9
1.3.2 Kryssreaksjoner .....	10
1.3.3 Metoder og prinsipp.....	10
1.4.0 Oppgavens hensikt .....	12
2.0.0 Materiale og metode .....	13
2.1.0 Prøvemateriale.....	13
2.2.0 Kalibrator og kontroll.....	15
2.3.0 Reagenser og utstyr .....	16
2.4.0 VirClia.....	17



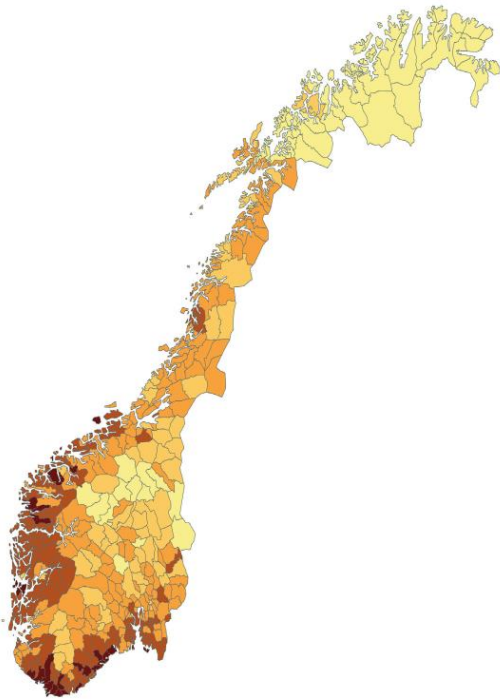
2.5.0 Fremgangsmåte for VirClia.....	18
2.6.0 RecomLine .....	18
2.7.0 Fremgangsmåte for RecomLine .....	19
3.0.0 Resultater .....	21
4.0.0 Diskusjon .....	27
5.0.0 Konklusjon.....	31
6.0.0 Referanser .....	32
7.0.0 Vedlegg .....	35

## 1.0.0 Innledning

### 1.1.0 Borreliose

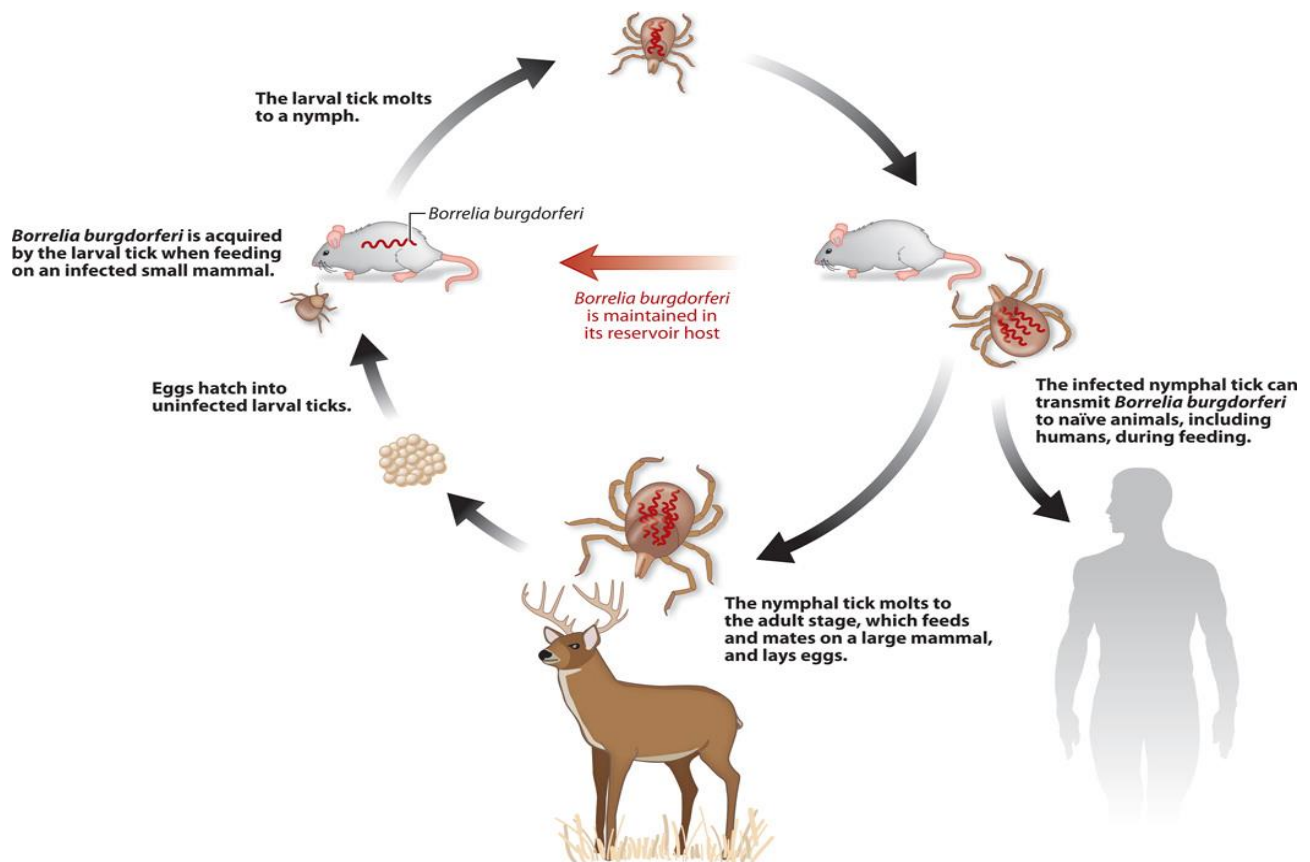
#### 1.1.1 Skogflått

I Norge finnes det et blodsugende insekt best kjent som flått. Flåtten trives i tempererte områder og er derfor å finne over hele Europa. I Norge finnes flåtten langs kysten fra Oslo til Helgeland. Den trives spesielt godt på Sørlandet og Vestlandet og finnes over alt i disse landsdelene, men er å finne i spesielt store antall i kystområdene. Flått trives i tett vegetasjon, i skyggen og finnes ofte i høyt gress. Den liker ikke tørke eller kulde og overlever ikke mer enn noen år i ugunstige forhold (1). Den fraktes over store avstander med fugler og kan dukke opp flere steder hvor det normalt ikke finnes mye flått. Figur 1 viser et kart over flåttbestanden i Norge. Da flåtten er blodsugende er de potensielle smittespredere for enkelte sykdommer. I nordlige deler av Europa blir flått betraktet som den verste smittespredende blodsugeren. Borreliose, også kalt Lyme borreliose, er den vanligste sykdommen overført via flåttbitt i Norge (2).



Figur 1: Utbredelsen av flått i Norge. Lyse farger indikerer fravær/liten forekomst, og mørke farger viser til høyere forekomst (3).

Sykdommen Borreliose er en vektoroverført zoonose, det vil si at den smitter fra dyr til menneske og borreliose spres til mennesker ved flåttbitt. Flåttan får *Borrelia*-bakterien ved å suge blod fra naturlige bærere av bakterien (smågnagere) tidlig i sin livssyklus. Og kan dermed gi den videre til mennesker som vist i Figur 2. Flåttan påvirkes ikke selv av bakterien. Flåttens spytt inneholder proteiner som er bedøvende, vasodilaterende, immunmodulerende og hindrer koagulering, noe som øker smittsomheten (4). De viktigste flåttartene som er bærere av bakterien tilhører *Ixodes* slekten. I Norge er den vanligste arten *Ixodes ricinus*, bedre kjent som skogflått (5).



Figur 2: Livssyklusen til flått med *Borrelia* og smitteoverføringen til mennesker (6).

### 1.1.2 Symptomer på Borreliose

Det er vanlig å dele sykdommen inn i lokalisert og disseminert stadium. Disseminert stadium deles inn i tidlig og sen fase. Borreliose kan debutere med symptomer fra hvilken som helst av stadiene nevnt. Tidlig lokalisert stadium kjennetegnes av et ringformet svakt rødt utslettet rundt bittstedet, sammen med en generell sykdomsfølelse. Utslettet kalles erythema migrans eller EM og forekommer 2-30 dager etter et flåttbitt (7,8). EM er avbildet i figur 3.



*Figur 3: varianter av erythema migrans (EM) kan variere i intensitet og farge fremstår med tydelige grenser og kan oppstå med «blink» i midten ved bittstedet. Modifisert figur (5).*

Tidlig disseminert stadium forekommer 4-8 uker etter smitte. Dersom bakterien i lokalisert stadium spres med blodet til andre steder av kroppen kan disseminert stadium dukke opp så lenge som 12 uker etter smitte. Denne fasen kan opptre med mange ulike symptomer, men det vanligste i Norge er akutt nevroborreliose, en betennelsestilstand som kan ramme alle deler av nervesystemet. Sent disseminert stadium kan opptre måneder til år etter smittetilfellet. Dette stadiet karakteriseres av utslett på oversiden av armer eller ben sammen med Acrodermatitis Chronica Atrophicans (ACA), en rød/lilla blålig misfarging i huden, og arraktig og tynn hud. Det kan gi leddsmerter, konsentrasjonsvansker, lammelser og svekket følsomhet i områder av huden (7,8).

Borreliose er en systemisk sykdom og påvirker flere av kroppens systemer og organer. De vanligste symptomene i Norge er utslettet EM og nevroborreliose. Nevroborreliose vil oftest gi subakutt innsettende nevrologiske symptomer fra uker til måneder etter infeksjon. Det vanligste er å få facialispause (ansiktsslammelse) eller fokale nevrogene smerter pga. radikulitt (betennelse i hjerne- eller ryggmargsnervenes røtter). Nevroborreliose kan også gi dobbeltsyn, nedsatt hørsel, lammelser, endret hudfølelse, gangvansker eller kognitive vansker (9). EM vil likevel være det mest klassiske og gjenkjennelige symptomet. Selv om det er svært sjeldent, kan borreliose også påvirke hjertet som fører til karbetennelse og avvik i hjertets elektriske system. Dette er et nett av nerveceller og nervebaner som sammen med hjertemuskelcellene får hjertet til å slå. Avvik vil da si rytmeforstyrrelser i hjertet. Sykdommen kan også gi artritt, uveitt (regnbuehinnebetennelse) og keratitt (hornhinnebetennelse). Et gjenkjennelig klinisk symptom på borreliose er når sykdommen påvirker huden og fører til lymfocytom, en rød/lilla hevelse oftest på øreflipp. Det kan også føre til ACA (10).

### 1.1.3 Behandling

Dersom borreliose behandles tidlig i sykdomsforløpet blir de fleste pasientene symptomfrie. Sykdommen behandles ofte med penicillin. For allergikere er det mest vanlig å behandle med doxycyklin. For å starte behandling må pasienten ha EM eller få påvist antistoffer mot bakterien. Dersom symptomene ikke går over ved hjelp av penicillin må legen vurdere om pasienten må bytte til en annen type antibiotika, eller bruke nåværende behandling over en lengere periode (7). Velger legen å bytte antibiotika kan dette være grunnet symptomer som borreliaartritt, ACA, eller lymfocytom, også i slike tilfeller vil doxycyklin være et vanlig alternativ. Ved mistanke om nevroborreliose eller hjerteborreliose kreves spesialistvurdering og behandling (11). *Borrelia*-bakteriens antibiotikafølsomhet skiller seg fra både grampositive og andre gramnegative bakterier. Den har naturlig resistens ovenfor en rekke typer antibiotika, og de ulike stammene av bakterien har svært variabel følsomhet mot antibiotika den ikke er resistent mot (4).

Hvis Borreliose forblir ubehandlet kan det føre til kronisk skade i nervesystemet, som igjen kan påvirke pasientens koordinasjon. Selv med behandling kan Borreliose gi langvarige plager. I omtrent 10% av pasienter med EM og enda høyere andel av pasienter med nevroborreliose, kan subjektive symptomer som utmattelse, kognitive vansker og muskel- og skjelettsmerter vedvare i

over seks måneder etter antibiotikabehandling (5). I enkelte tilfeller har disse symptomene vist seg å vedvare i over ti år. Ved borreliaatritt har ca. 1 av 10 pasienter smertefulle og hovne ledd i alt fra måneder til år etter endt behandling (7). Selv om de fleste vil oppleve at plagene forsvinner med tid og behandling, vil enkelte pasienter aldri bli helt friske (5,7).

### 1.2.0 *Borrelia burgdorferi*

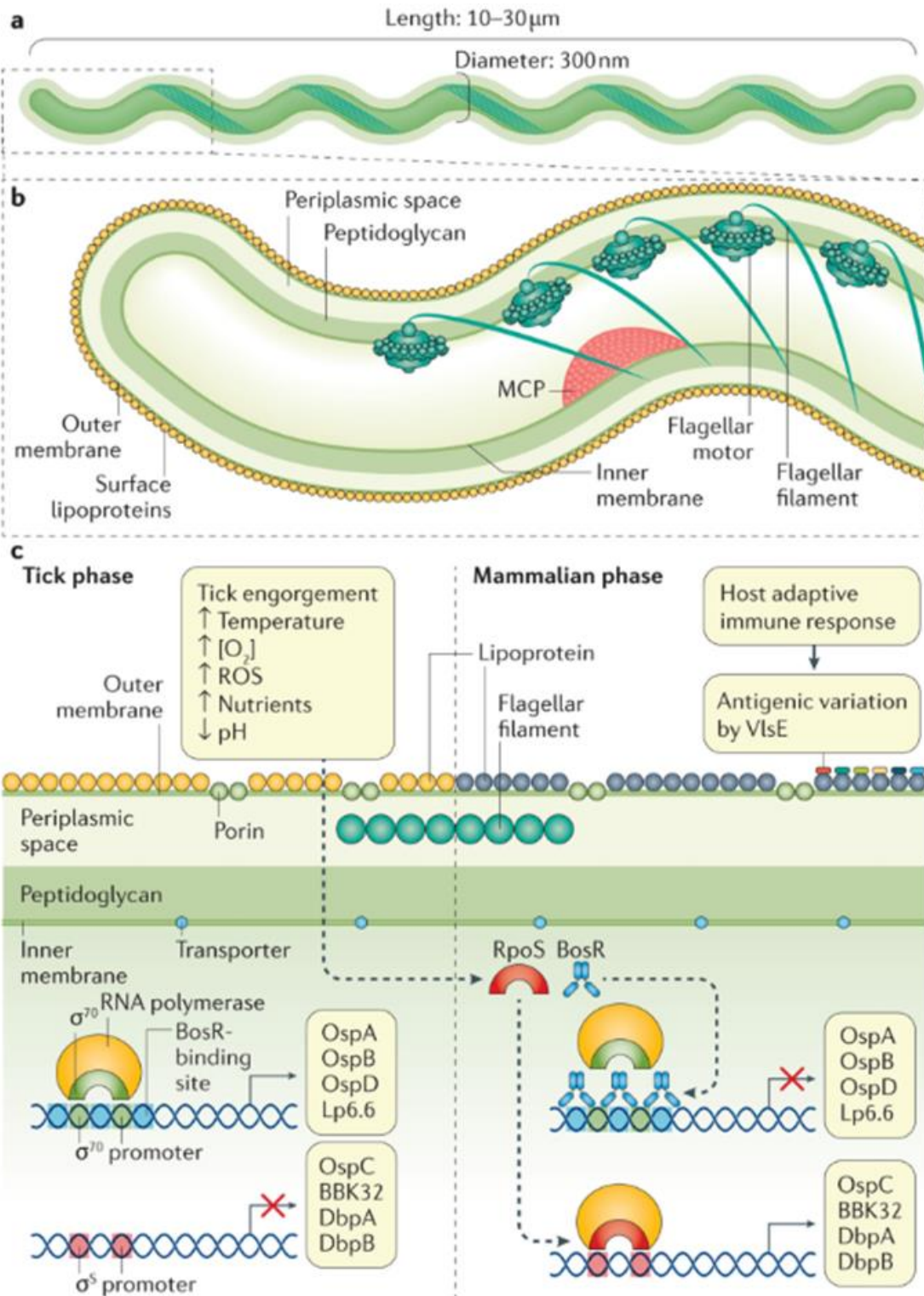
#### 1.2.1 Morfologi

Bakterien *Borrelia burgdorferi* forårsaker Borreliose og har en gjenkjennelig morfologi. Bakterien er en gramnegativ, bevegelig, trådformet og spiralsnodd bakterie, også kalt en spiroket. Den kan være mikroaerofil eller anaerob, og er fakultativ intracellulær. Bakterien måler 0,18-0,3 µm i bredde og 10-30 µm i lengde som vist i figur 4a. *B. burgdorferi* har 7-11 aktive flageller plassert i bakteriens periplasmatiske rom. Dette er karakteristisk for bakteriens morfologi. Som vist i figur 4b er flagellene festet til hver cellepol og tvinner seg rundt cellen i det periplasmatiske rommet mellom peptidoglykanlaget og den ytre membranen. Flagellemotorer er lokalisert på cellepolene ved siden av metyl-aksepterende kjemotaksiproteiner, som også kalles MCP. Disse styrer bakteriens bevegelse mot kjemoattraktanter og bort fra kjemofrastøtere. Kjemoattraktanter er kjemiske substanser som vil få bakterien til å bevege seg mot steder som har en høyere konsentrasjon av disse, mens kjemofrastøtere vil ha motsatt effekt (4,5).

*Borrelia burgdorferi* er en gramnegativ bakterie. Karakteristisk for gramnegative bakterier er lipopolysakkarider (LPS) som fungerer som endotoksiner. Lipid A er den grunnleggende komponenten i LPS og er ansvarlig for endotoksinaktiviteten (12). En del av celledmembranen til alle celler er et lipidbilag som skiller overgangen fra cytoplasma til det ekstracellulære rommet. Dette bilaget består av et dobbelt fosfolipid lag der fosfolipidenes hydrofobe haler vender inn mot hverandre og dens hydrofile hode vender ut mot cytoplasma og utsiden av cellen (13). *Borrelia burgdorferi* er derimot svært ulik andre gramnegative bakterier. Den ytre membranen mangler LPS, men den har lipid bilaget som igjen består av fosfolipider og glykolipider. Bakteriens ytre membran består også av kolesterol i form av glykolipider som danner flåteliknende mikrodomener av lipider, også kalt lipidflåter. Disse kan endres i rekkefølge og størrelse i forhold til temperatur. Dette er svært viktig ved overføring av bakterien fra flått som

vektor til mennesket som vert. Temperaturen endrer seg mellom de forskjellige vertene (mus, flått, menneske og andre) og bakterien må kunne tilpasse seg alle miljøene (5).

Den ytre membranen inneholder også overflate lipoproteiner som kan endre uttrykk avhengig av omgivelsene. For eksempel vil outer surface protein A (OspA), være uttrykt når bakterien befinner seg hos flått. OspA vil byttes ut med outer surface protein C (OspC) ved tidlig infeksjon hos pattedyret som vist i figur 4c (5). Disse overflateproteinene spiller en rolle i stabiliteten til mikrodomenene, men er ikke like viktige som kolesterol (14). OspC er likevel svært viktig ved påvisning av antistoffer mot bakterien. I tillegg er virulensegenskapene som fører til infeksjon ansett for å være sterkt knyttet til OspC (4). p41i, p39, p17, VlsE og OspE er eksempler på andre proteiner hos *B. burgdorferi* som er viktige ved deteksjon av ulike genotyper av bakterien ved diagnostikk.



Figur 4: Bakterien *Borrelia burgdorferi* og dens morfologi, a: bakteriens størrelse og form, b: bakteriens oppbygging med navn, c: transkripsjonell regulering av overflateproteiner, MCP = metyl-aksepterende kjemotaksiproteiner (5).



### 1.2.2 Bakteriens genom

*B.burgdorferi* har også et svært uvanlig genom. Det består av et lineært kromosom på 910 kbp, og minst 12 lineære og ni sirkulære plasmider som varierer i lengde fra 5-54 kbp. Andre bakterier med så stor mengde plasmider per celle er ikke kjent, og lineært genom er svært uvanlig blant mikroorganismene. Selv om mange av plasmidene gjerne mistes i kultur, vil de gjenværende anses som viktige for bakterien og kalles gjerne «minikromosomer». Noen av dem koder for proteiner som er viktige virulensfaktorer. OspA-F er alle plassert på bakteriens overflate og genene som produserer disse er plassert på plasmider. Disse genene er kodet for å produsere mer enn 100 lipoproteiner, som er mer enn hos andre kjente bakterier (15).

Genene kan ha mange ulike funksjoner. For eksempel bevegelighetsrelaterte gener opptar over 6% av bakteriens genom og gir bakterien evnen til å bevege seg for egen maskin. Et annet eksempel på funksjonen til gener er at som svar på bakterieinfeksjonen vil verten produsere toksiske oksygen- og nitrogenforbindelser. Dette vil påføre bakterien oksidativt stress som igjen vil aktivere stressrelaterte gener for produksjon av enzymer som beskyttelse mot oksidasjon. Bakterien inneholder ingen gener for cellulær biosyntesereaksjon, og må derfor dyrkes i et komplekst medium for å gi vekst (4).

### 1.2.3 Virulens og etablering av infeksjon

*Borrelia*-bakterien har flere mekanismer for å etablere infeksjon i verten. To av bakteriens lipoproteiner binder seg til proteoglykanet decorin som «dekorerer» kollagene fibre. Den kan også binde seg til dermatansulfat, heparin, integrin og fibronectin. Bakterien degraderer også uoppløselige komponenter av vertens ekstracellulære matriks som øker invasiviteten. Det er vist at *B.burgdorferi* bruker feromoner som en viktig mekanisme til kommunikasjon for å kontrollere proteinproduksjon, og for å koordinere ulike funksjoner (16–18). For å unngå den alternative komplementveien i immunforsvaret hos ulike dyrearter produserer bakterien mange ulike Erp-proteiner på den ytre membranen sin, som kan binde de komplementhemmende molekylene faktor H og faktor H-liknende protein. Bakterien kan dermed motstå komplementmediert drap og fagocytose hos hvilken som helst av vertene den infiserer (19). Modifisering av overflateproteiner er en annen mekanisme bakterien benytter for å unngå antistoffangrep. OspE gjennomgår ofte store antigene variasjoner som følge av rearrangementer i DNA, og OspA og -C

modifiseres og nedreguleres slik at de ikke bindes til beskyttende antistoffer. Dette er viktigst for bakterien ved tidlig infeksjon (4).

Et karakteristisk immunologisk fenomen for Borreliose er sirkulerende immunkomplekser. Disse finnes i serum, spinalvæske og synovialvæske. Når disse ikke blir godt nok fjernet av det retikuloendoteliale system vil de avsettes i vev og organer og aktiverer komplementet. Dette kan føre til lokal inflammatorisk vevsdestruksjon, og vises ved symptomer som EM. Sirkulerende immunkomplekser kan også påvirke Fc-reseptorene hos verten så disse blir defekte, slik at opsoniserte *Borrelia*-bakterier ikke kan fjernes av monocytter (4).

### 1.3.0 Påvisning av antistoffer mot *Borrelia Burgdorferi*

#### 1.3.1 Diagnostisering

Diagnosen EM stilles hovedsakelig basert på symptomer, og ved annen Borreliose stilles diagnosen vha. en kombinasjon av symptomer og mikrobiologisk diagnostikk. Det er altså mulig å påvise antistoffer fra en infeksjon med *B. burgdorferi* på laboratoriet, men det benyttes kun som et hjelpemiddel. For å utelukke Borreliose vil en negativ test ikke være tilstrekkelig. Faktorer og grunnlag for å stille diagnosen er: smittetidspunkt, varighet av symptomer, type symptomer og objektive funn (f.eks. å finne flåtten på huden). Tidlig i sykdomsforløpet har de fleste pasienter ikke rukket å utvikle detekterbare antistoffer, og testen kan bli negativ til tross for hissig symptomer (20). Årsaker til lav antistoffproduksjon inkluderer at bakterien aktivt fester seg til, invaderer og dreper T- og B-lymfocytter og har evnen til å skjule seg med vertens materiale ved å være fakultativ intracellulær (4).

Antistoffer kan også bli værende i kroppen i måneder og til og med år etter at bakteriene er drept. Har pasienten gjennomgått en *Borrelia* infeksjon tidligere kan antistoffene «henge igjen» etter endt antibiotikabehandling. Dette er noe av grunnen til at symptomer og det kliniske er så viktig (5). Statistisk sentralbyrå (SSB) kunne i 2012 rapportere om 255 tilfeller av Lyme borreliose, men grunnet grunnlaget for å stille diagnosen kan det faktiske tallet være noe høyere. SSB viser også at tallet steg noe fra 150 i 2000 til 280 i 2005 og har siden ligget over 240 (21).

### 1.3.2 Kryssreaksjoner

Andre patogene spiroketer i familien *Spirochaetaceae*, samme familie som *B. burgdorferi*, kan også gi diagnostiske utfordringer i form av en kryssreaksjon ved bruk av *Borrelia* IgM tester. Den mest vanlige spiroketen er *Treponema pallidum* som forårsaker syfilis. Denne har lenge vært kjent da sykdommen først ble observert over 500 år siden, og den bakterielle årsaken ble bestemt i 1905. *B. burgdorferi* er i forhold til *T. pallidum* relativt nylig oppdaget da bakterien først ble beskrevet i 1981. Tester for påvisning av syfilis har da vært i utvikling mye lenger enn påvisning av antistoff mot *Borrelia* (22,23). *T. pallidum* er ganske lik *B. burgdorferi* og en syfilisinfeksjon kan da potensielt gi en falsk positiv *Borrelia* antistofftest (24). *T. pallidum* ble valgt for å teste potensialet for kryssreaksjon da syfilis forekommer relativt ofte i den norske befolkning. I 2012 ble det rapportert 110 tilfeller av syfilis i Norge til SSB som er en stor økning fra 2005 med bare 24 rapporterte tilfeller (21).

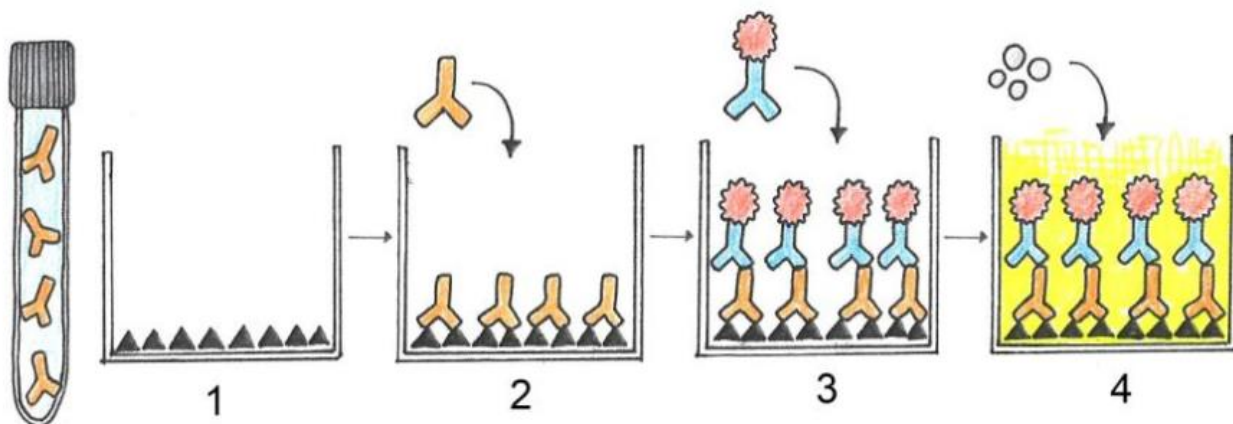
### 1.3.3 Metoder og prinsipp

Ved St.Olavs hospital undersøkes det for antistoff mot *Borrelia*-bakterien med screening på instrumentet Liaison XL fra DiaSorin. Dette er et helautomatisk instrument som bruker kjemiluminescensteknologi (vedlegg 1). Metoden for bestemmelse av IgM antistoffer på Liaison er en indirekte kjemiluminescens-immunoanalyse. Magnetpartikler benyttes som fast fase og er belagt med rekombinant antigen. Under den første inkubasjonen vil antistoffer som er til stede i prøven binde seg til magnetpartiklene. Under den andre inkubasjonen vil antistoff-konjugat (museantistoff festet til isoluminolderivat) reagere med *Borrelia* IgM. Til slutt tilsettes startreagenser som induserer en rask kjemiluminescens reaksjon. Lyssignalet måles vha. en fotomultiplikator som anslår konsentrasjonen av *Borrelia burgdorferi* IgM antistoffer (Vedlegg 4).

Liaison XL påviser både IgG og IgM antistoff, men produsenten kan ikke garantere for riktig prøvesvar ved usikre IgM prøver (Vedlegg 1). Ved usikkert IgM resultat må prøveresultatet bekreftes med en alternativ test. Per dags dato brukes testen *Borrelia* IgM Line Blot fra recomLine, en manuell metode, som konfirmasjonstest. Metoden bygger på en antigen/antistoff reaksjon og er en kolorimetrisk metode, men tar opp mye ressurser og tid (vedlegg 2).

Laboratoriet har derfor kjøpt inn et nytt instrument, VirClia, som er en helautomatisk ELISA

prosessor for mikroplateanalyse med kjemiluminescens teknologi (vedlegg 3). ELISA som vist i figur 5 er en sensitiv immunologisk metode som benyttes til å måle små mengder biologiske substanser. ELISA-metoder benytter antistoffer som bindes til enzymer og utløser en fargereaksjon når dette komplekset igjen bindes til substansen som skal måles. Fargeintensiteten vil da vise til konsentrasjonen av testsubstansen (25).



Figur 5: Skjematisk fremstilling av ELISA-prinsippet (indirekte ELISA). Antistoff fra prøven bindes til antigen på fast fase og enzymlbundet antistoff (konjugat) bindes til disse igjen. Substrat reagerer med enzymene som danner en fargeendring (26).

Det finnes flere undergrupper av ELISA-metoder selv om alle bygger på antistoff/antigen reaksjoner med enzymer. Figur 5 viser indirekte ELISA som er metoden benyttet av VirClia, men det eksisterer også direkte, sandwich og konkurrerende metode. Det som skiller metodene fra hverandre er hvordan antistoff binder seg til antigen og eventuelt annen tilstedeværende komponenter. For eksempel var direkte ELISA den første metoden som ble oppfunnet og blir betraktet som den enkleste. Enzymmerkede antistoff reagerer direkte med antigener og substrat som gir fargeendring. Det har blitt vanlig å benytte en ELISA-metode for peptid og proteinanalyser pga. at ELISA er en relativt spesifikk og presis metode som gir et raskt resultat og er enkel å gjennomføre (27).

#### 1.4.0 Oppgavens hensikt

Hensikten med bachelorprosjektet var å sammenlikne VirClia for testing av IgM antistoffer mot *Borrelia burgdorferi* med dagens Line Blot metode. Resultatene fra VirClia sammenliknes med resultater på Line Blot fra recomLine. Sykehuset ønsker at det nye instrumentet skal ta over identifiseringen av IgM antistoff mot *Borrelia* ved St. Olavs hospital, da VirClia kan benyttes oftere enn Line Blot og gir raskere svar til rekvirenten.

## 2.0.0 Materiale og metode

### 2.1.0 Prøvemateriale

Sammenligningsgrunnlaget mellom nåværende metode og ny metode baserte seg på et panel med 59 prøver. Pasientprøvene var fra 2022 og 2023, disse ble oppbevart i fryser ved -20°C før analysering, og i kjøleskap ved 4°C i perioden prøvene ble analysert. Forkortelsene som ble benyttet for prøvegruppene er:

- PSNB = Tidligere positiv screening analyser som ble negativ på blot.
- P-SY = Testet positivt for syfilis
- P = Tidligere positive screening analyser
- N = Tidligere negative screening analyser
- P-SLP = Positive Sammenliknbare laboratoriske prøver

Tabell 1 viser en oversikt over prøvene og hvor mange prøver det er i de ulike gruppene.

*Tabell 1: Antall og type prøver benyttet i det praktiske arbeidet.*

Type prøve	Antall
Positive på Liaison og tidligere negative på Line Blot	15 (1 ekstra med grenseverdi)
Positive for syfilis	6
Positive på Liaison	20
Negative på Liaison	6
Sammenliknbare laboratoriske prøver (SLP)	10
Driftskontroll	1
Totalt	58 (59 med ekstra grenseverdi)

Nærmere forklaring av prøvegruppene:

- Positive sammenliknbare laboratoriske prøver (SLP), er prøver som bestilles fra firmaet EQUALIS. Samme prøve leveres til alle laboratorier som ønsker å teste sin metode og sammenlikne med andre laboratorier, det følger med fasitsvaret fra firmaet. Fasiten fra firmaet for IgM antistoff mot *Borrelia* graderes med negativ, grenseverdi, svak positiv og sterk positiv. Får metoden en verdi som passer med fasitsvaret har den nøyaktige tallverdien ingen betydning.
- Driftskontrollen ble laget på laboratoriet og brukt (som normalt) i screeningmetoden på Liaison, i tillegg til at den ble brukt som en sikker analyse i denne oppgaven. Fasitsvaret for driftskontroll regnes ut fra gjennomsnittet av ti analyseringer.
- Serumprøver kjent positive for syfilis ble inkludert da det var ønskelig å undersøke kryssreaktivitet. Syfilis ble valgt da denne spiroketen er aktiv i det norske folk og sannsynligheten for at en prøve som skal testes for antistoff mot *borrelia* kan ha syfilis er til stede.
- Positive og negative screening prøver benyttes for å teste vanlige prøver som vil gi både positive og negative resultater. Selv om Liaison ikke er en «gullstandard» er det den etablerte screeningmetoden.
- PSNB er prøver som tidligere fra før oppgaven begynte var analysert på både Liaison og Line Blot. Alle prøvene i denne kategorien fikk positivt svar på Liaison og negativt på Line Blot som blir tolket som falskt positivt liaisonresultat i og med at Line Blot har bedre spesifisitet og sensitivitet sammenlignet med screeninganalysen (Liaison) (Vedlegg 2). I resultater og for sammenligningsgrunnlag benyttes Line Blot resultatene funnet ved reanalysering under denne oppgaven.

## 2.2.0 Kalibrator og kontroll

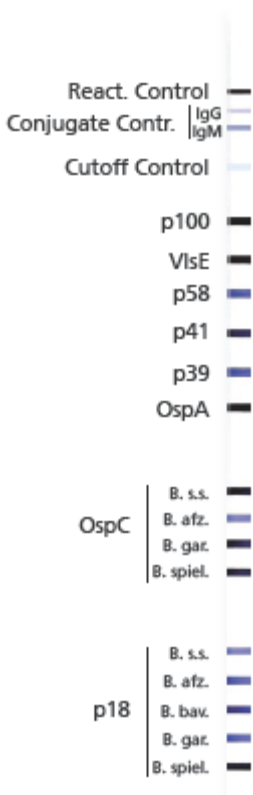
Både kalibrator og kontroll utgjør en del av stripsen som benyttes for den enkelte analysen på VirClia. Stripsen er en rekke med plastbrønner som inneholder kalibrator, kontroll og reagens som benyttes for den spesifikke analysen. Alle kalibratorene og kontrollene for VirClia leveres av Vircell og bestilles ferdig laget i disse stripsene tilhørende en spesifikk analyse. Figur 6 viser en strips til VirClia fra Vircell med oversikt over brønner, funksjon og innhold. Dette gjør at instrumentet alltid er kalibrert for analysen som blir utført og bioingeniørene slipper å sette på egne kalibratorene og kontrollene med jevne mellomrom.



Figur 6: Strips tilhørende VirClia og leveres av Vircell. Inneholder tre åpne reaksjonsbrønner belagt med antigener, og fem lukkede reagensbrønner. Konjugatbrønner inneholder anti-human IgM peroksidase konjugatfortynning. Fortynningsløsningen inneholder proteinstabilisatorer og anti-human IgG. Kalibratoren er en positiv serumløsning. Substrat B inneholder peroksid, og substrat A inneholder luminol (28).

Line Blot av recomLine har også innebygget kontroll i form av bånd for den spesifikke analysen på en annen type strips. Stripsen som benyttes ved Line Blot er en strimmel som inneholder bånd av antigener. Disse vil reagere med de respektive antistoffene i prøven og det vil skje en fargeendring hvor intensiteten på blåfargen viser til hvor mye antistoffer som er til stede. Line Blot benytter ingen kalibrator da det er intensiteten på stripsens cut-off kontrollbånd som viser til positivt eller negativt resultat, dette kommer frem i figur 7.





Figur 7: Strips tilhørende Line Blot fra recomLine. Båndene nedover viser de ulike kontrollene, og hvilke av bakteriens proteiner som detekteres (29).

### 2.3.0 Reagenser og utstyr

#### VirClia:

- VirClia produsert av Vircell, Spania.
- BORRELIA VIRCLIA IgM MONOTEST
- DECONTAMINATION SOLUTION, Vircell.

#### RecomLine:

- Kit: recomLine Borrelia IgM fra Mikrogen Diagnostik, Tyskland.
- Skanner: Plustek OpticPro S28 levert av Mikrogen Diagnostik.

#### 2.4.0 VirClia

Til den nye metoden for testing av IgM antistoff mot *Borrelia* benyttes instrumentet VirClia. Fordelen med VirClia metoden er at den kan analyseres daglig ved behov da den tar betydelig mindre tid og ressurser. Instrumentet kan utføre stegene for prøveprosessering inkludert fortynninger, distribusjon, inkubasjon, blanding og vaskeprosesser. Det benytter fotometrisk og luminescens måling og vurdering, og benytter standard bølgelengder på 405, 450, 490, 550 og 630 nm (Vedlegg 3).

Metoden VirClia bruker for å identifisere IgM antistoff mot *Borrelia* er en våtkjemisk indirekte ELISA-metode, som bygger på antistoff/antigen reaksjoner. Dersom prøven har *Borrelia*-spesifikke antistoff dannes det antigen/antistoff – komplekser før ubundne reaktanter vaskes vekk. Enzym-merkede anti-humant globulin binder seg til komplekset i en ny fase etterfulgt av vasking. Et kjemiluminiserende substrat reagerer med de enzym-merkede antistoffene som ikke er vasket vekk. Dersom det er enzymer til stede skaper dette en selvlysende effekt som kan leses av på et luminometer (Vedlegg 5).

Reaksjonen foregår vha. strips man setter på instrumentet levert av selskapet Vircell. Stripsen har åtte brønner hvorav de tre første, brønn A, B og C, er reaksjonsbrønner. Disse er belagt med en kombinasjon av rekombinante antigener fra patogene arter av *Borrelia azfелиi* (OspC), *Borrelia garinii* (OspC, VlsE), *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (OspC), *Borrelia burgdorferi sensu lato* (p41i, p39, p17 og OspE) og *Borrelia spielmanii* (OspC). De fem siste brønnene er reagensbrønner. Brønn D inneholder konjugatet, altså antistoffer koblet med enzymer. Brønn E inneholder serum fortynningsløsning. Brønn F inneholder en fargeløs kalibrator som er en positiv serumløsning. Brønn G inneholder fargeløs substratkomponent B, og brønn H inneholder fargeløs substratkomponent A (vedlegg 5). Kalibrator fra brønn F blir tilsatt i reaksjonsbrønn A som positiv kontroll. Prøven blir tilsatt i reaksjonsbrønn B sammen med fortynningsbufferen fra brønn E. Kalibrator fra brønn F blir tilsatt i brønn C sammen med fortynningsbuffer fra brønn E som negativ kontroll. Substratkomponentene fra brønn G og H tilsettes hver av reaksjonsbrønnene til slutt hvor de reagerer med prøven og med hverandre.

### 2.5.0 Fremgangsmåte for VirClia

Ved daglig oppstart ble instrumentet først skylt gjennom med vaskebuffer. VIRCLIA® WASHING SOLUTION fra Vircell ble blandet i laboratoriet med fortykning 1:20 og var holdbar i to uker. Strips til analyser ble tatt ut av kjøleskap for å oppnå romtemperatur før primer startet.

Det måtte lages en ny arbeidsliste for hver gruppe med prøver, og navnet på prøvebulken som ble analysert ble da skrevet inn. F.eks «pos screening neg blot». Deretter ble prøvene registrert ved at hver prøve ble skannet manuelt på instrumentets barkodeleser. Hver prøve kunne plasseres i alle ledige plasser i prøvestativet og instrumentet registrerte posisjonen automatisk. Etter skannet prøve var plassert i instrumentet ble neste prøve skannet fortløpende. Analysen for IgM antistoff mot *Borrelia* som skulle utføres på prøvene for denne oppgaven, måtte legges inn manuelt ettersom de ikke var rekvirert av lege (med rekvisisjon ligger analysene inne automatisk når prøvene scannes, selv om det er lurt å dobbeltsjekke før analysering). Ved start av en ny bulk med prøver fortløpende etter endt analysering ble gamle prøver tatt av instrumentet og det ble laget ny arbeidsliste. Deretter kunne nye prøver legges inn. Etter endt analysering ved dagens avslutning, ble daglig «shut down» prosedyre fulgt hvor instrumentet ble rensset med deionisert vann.

### 2.6.0 RecomLine

Dagens metode for testing av IgM antistoff mot *Borrelia* gjøres ved bruk av Line Blot fra recomLine. Denne metoden er en immunoassay som baserer seg på antigen/antistoff reaksjon. Line Blot er også en våtkjemisk metode, men i stedet for å bygge på kjemilumenisens som VirClia benytter Line Blot kolorimetri. Dersom de rette antistoffene er til stede, vil de binde seg til antigenene festet til stripsen. Deretter fjernes ubundne antistoffer, og IgM anti-humant immunglobulin antistoff bundet til peroksidase fra pepperrot (HRP) tilsettes og reagerer med antistoff/antigen kompleksene. Ubundet antistoff (konjugat) vaskes deretter bort og fargeendringen katalyseres av gjenværende HRP ved tilsetting av substratet. Dersom en antigen/antistoff reaksjon har funnet sted vil stripsen farges blå (vedlegg 6). Sikkerhetsdatablad viser substratets kjemiske komponenter (Vedlegg 7).

Testen kan identifisere spesifikke antistoffer mot *Borrelia*-bakterien ved hjelp av en strips med separate antigener. I testen vil rekombinante proteiner appliseres i en nitrocellulosemembran, som igjen festes til en strips (Vedlegg 2). Et rekombinant protein er et protein kodet av DNA fra forskjellige kilder, og blir satt inn i en vektor for å uttrykkes (30). Alle stripsene inneholder en kontroll for å redusere antall falske negative tester (Vedlegg 2).

Line Blot fra recomLine har økt spesifisitet og sensitivitet sammenlignet med screeninganalysen på Liaison. Testen kan påvise antistoff mot alle de fem kjente immunopatogene genotypene av bakterien (*B. burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia spielmanii*, *B. afzelii*, *B. garinii* og *B. bavariensis*). Stripsen har serumkontroll og antistoff katalasekontroll i de første båndene for å sikre at rett konjugat er tilsatt. Som en kontroll har stripsen et cut-off bånd der fargeintensiteten på båndet definerer cut-off for den spesifikke stripsen (Vedlegg 2). Se figur 7 for oppsett og hvilken antigen som tilhører hvilket bånd. Stripsen tester for antigen: Osp A, Osp C, p100, VlsE, p39, p58, p18 (= DbpA, decorin-binding protein A) (vedlegg 6). Svaret gis ut som positiv, grenseverdi eller negativ og vurderes både ut ifra antall strips med fargeendring og intensiteten på fargeendringen målt opp mot cut-off. Ulempen med Line Blot er at analysen kun utføres en til to ganger i uken. Grunnen til dette er at analysen er tidkrevende og laboratoriet har ikke ressurser til å analysere hver prøve som kommer inn fortløpende.

### 2.7.0 Fremgangsmåte for RecomLine

Til å begynne med ble det laget vaskebuffer og konjugat. For vaskebufferløsning ble det blandet en pose med skim milk powder i 100 mL Wash-Buffer A, og løsningen lå i 15 min på Stuart rollemixer. Deretter ble løsningen blandet i 900 mL destillert vann. Løsningen er da holdbar i fire uker ved 2-8°C. Deretter ble det laget konjugatet til hvert oppsett ut fra hvor mange strips som ble benyttet (se tabell 2).

Tabell 2: Tillaging av konjugat

Antall strips	Mengde IgM konsentrert konjugat	Mengde tilsatt bruksferdig vaskebuffer A
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml

Aktuelle prøver ble funnet fram og arbeidsliste ble skrevet ut ifra tilsendt skjema fra leverandør. 2 ml fortynningsløsning ble tilsatt til brønnene i Blot-karet før strips ble lagt i brønnene ut ifra nummeret øverst på stripsen. Deretter ble 40 µL prøvemateriale tilsatt i korrekte brønner ut fra arbeidsliste.

Prøvene ble først inkubert i 60 min på vippe før stripsene ble vasket 4 ganger i 5 min med 2 ml vaskebuffer per gang. Videre ble konjugat tilsatt med et volum på 2 ml og prøvene ble inkubert i nye 45 min på vippe. Vaskeprosedyren ble gjentatt og det ble tilsatt 1,5 ml substrat etter vask. Prøvene ble inkubert i 8 min på vippe før stripsen ble vasket tre ganger i 2 ml dest. vann. Stripsene ble så lagt til tørk i minimum 30 min. Stripsene ble så montert på blot skjemaet med rett strips ved rett prøve og strips nummer. Det ble på forhånd påført en stripe med lim nedover på arket for å få stripsene til å sitte fast. Reaksjonskontrollbåndet på stripsen ble plassert på linje med reaksjonskontrollbåndet på *Borrelia*-Blot arbeidsskjema. Stripsene ble lest av på skanner: Plustek OpticPro S28, og dokumentet ble overført til minnepenn. Stripsene ble teipet til blotarket og hvert blotark ble lagt i hver sin plastmappe og arkivert. Eksempel på montering av Lineblot se vedlegg 8. De samme prøver har blitt skannet og for sammenligning og eksempel på ferdige analyseresultater se vedlegg 9.

### 3.0.0 Resultater

Borrelia IgM ble analysert vha. både VirClia og Line Blot fra recomLine. Dette ble gjort for å kunne sammenligne resultatene med tanke på å eventuelt erstatte Line Blot Borrelia IgM med VirClia. Vha. VirClia vil prøveresultatet vises som en indeksverdi spesifikk for instrumentet, med tolkning av hvorvidt prøven er positiv (pos), negativ (neg) eller equivocal (grenseverdi, altså kan instrumentet ikke si om prøven er positiv eller negativ). Indeksverdien fordeler seg slik: 0-0,9 = neg, 0,9-1,1 = grenseverdi og >1,1 = pos (vedlegg 5).

Line Blot viser til om stripsen er positiv, negativ, eller grenseverdi, og angir hver strips med en tallverdi. Tallverdiene regnes ut ifra hvor mange bånd på stripsen som har reagert med substratet, og intensiteten av disse. Den måler antall reagerte bånd og om fargeforandringen er sterkere eller svakere enn Cut-off. Dette gir en tallverdi hvor <fem tilsvareer negativ, seks tilsvareer grenseverdi, og >syv tilsvareer positiv (vedlegg 6). Grenseverdien er funnet med å ta +/- 20% av Cut-off. Eksempel på resultatutskrift fra Line Blot med tallverdi se vedlegg 9.

Prøvene har på ulike tidspunkt tidligere blitt undersøkt vha. instrumentet Liaison XL. Ingen Liaison resultater er eldre enn ett år. Liaison har målt en egen verdi for prøvene uttrykt i AU/ml (Arbitrary Units/ml). Dette er en måleenhet unik for analysemaskinens produsent. Denne enheten lar seg ikke konvertere til internasjonale standarder. I kolonnen helt til høyere i tabellene under vises tallverdien fra tidligere målinger for de aktuelle prøvene på screeningmetoden Liaison. Disse målingene ble gjennomført før oppgaven startet og er tatt med for å vise prøvenes screeningsvar. De benyttes da for å se om prøvene tidligere har blitt sterk eller svak positiv. Cut off for IgM er 20 AU/ml, grenseverdiene for gråsoner ligger på øvre grense 22 AU/ml og nedre grense 18AU/ml. Dette betyr at alt over 22 AU/ml er positive svar og alt under 18AU/ml er negative ifølge Liaison. En svak positiv prøve får et resultat som er positivt så over 22AU/ml men under 40 AU/ml (vedlegg 10).

Tabell 3-7 viser resultatene fra prøvene analysert med både Line Blot og VirClia, hver tabell representerer en definert gruppe med prøver. Under tabellene er det regnet ut hvor mange prosent av resultatene som avviker fra hverandre. Tillatt avvik er satt til <10% av AMM. Tabell 3 viser 16 prøver i gruppen som tidligere ble analysert som positive på Liaison og negative på Line Blot.

Dette ble analysert for å teste VirClia opp mot en gruppe hvor analysen ville blitt brukt i en reel situasjon, altså å undersøke falske positive resultater. 6/16 prøveresultater stemmer ikke overens mellom blot og VirClia dette gir et avvik på 37,5%.

Tabell 3: IgM antistoff mot Borrelia undersøkt vha. Line Blot og VirClia. Prøver med et tidligere resultat som positive på Liaison XL IgM antistoff mot Borrelia (rutinemetoden), og negative på blot.

ID	Målt verdi Line Blot poeng	Pos/Neg/Borderline Line Blot	Målt verdi (index) VirClia	Pos/Neg/Borderline VirClia	Tidligere verdi målt med Liaison AU/ml
PSNB 1	6	Borderline	1,865	Pos	50
PSNB 2	0	Neg	0,636	Neg	28
PSNB 3	1	Neg	0,931	Borderline	24
PSNB 4	0	Neg	0,509	Neg	29
PSNB 5	8	Pos	0,668	Neg	31
PSNB 6 (GRV)	9	Pos	4,353	Pos	128
PSNB 7	5	Neg	0,544	Neg	37
PSNB 8	0	Neg	0,216	Neg	26
PSNB 9	0	Neg	0,202	Neg	118
PSNB 10	0	Neg	0,304	Neg	42
PSNB 11	1	Neg	0,594	Neg	37
PSNB 12	0	Neg	0,065	Neg	159
PSNB 13	0	Neg	0,188	Neg	129
PSNB 14	0	Neg	1,083	Borderline	71
PSNB 15	0	Neg	2,398	Pos	40
PSNB 16	0	Neg	2,226	Pos	29

Tabell 4 viser 6 prøver som testet positivt på syfilis. Denne gruppen testes for å sjekke kryssreaktivitet da bakteriene er i samme familie og det kan oppstå falske positive resultater. 1/6 av resultatene stemmer ikke overens mellom blot og VirClia. Dvs. 16,7% avvik.

Tabell 4: IgM antistoff mot Borrelia undersøkt vha. Line Blot og VirClia. Prøver som er kjent positive for syfilis, tidligere analysert for IgM antistoff mot Borrelia på Liaison.

ID	Målt verdi Line Blot poeng	Pos/Neg/Borderline Line Blot	Målt verdi (index) VirClia	Pos/Neg/Borderline VirClia	Tidligere verdi målt med liaison AU/ml
P-SY 1	0	Neg	0,578	Neg	8
P-SY 2	0	Neg	0,279	Neg	4,4
P-SY 3	0	Neg	0,461	Neg	7
P-SY 4	0	Neg	0,069	Neg	7,4
P-SY 5	0	Neg	0,162	Neg	21,4
P-SY 6	8	Pos	0,431	Neg	12,6

Tabell 5 viser resultatene fra 20 prøver tidligere besvart som positive av screeningmetoden på Liaison. 4/20 av resultatene stemmer ikke overens mellom Line Blot og VirClia som utgjør et avvik på 20%.



Tabell 5: IgM antistoff mot Borrelia undersøkt vha. Line Blot og VirClia. Positive prøver målt på Liaison.

ID	Målt verdi Line Blot poeng	Pos/Neg/Borderline Line Blot	Målt verdi (index) VirClia	Pos/Neg/Borderline VirClia	Tidligere verdi målt med liaison. AU/ml
P 1	19	Pos	2,142	Pos	>190
P 2	9	Pos	4,461	Pos	111
P 3	6	Borderline	7,880	Pos	>190
P 4	0	Neg	1,220	Pos	98
P 5	0	Neg	0,109	Neg	128
P 6	19	Pos	2,140	Pos	114
P 7	10	Pos	1,100	Borderline	154
P 8	8	Pos	4,015	Pos	102
P 9	10	Pos	1,413	Pos	>190
P 10	0	Neg	6,682	Pos	>190
P 11	8	Pos	2,338	Pos	99
P 12	9	Pos	3,270	Pos	125
P 13	8	Pos	3,854	Pos	125
P 14	10	Pos	1,285	Pos	>190
P 15	9	Pos	6,951	Pos	>190
P 16	0	Neg	0,215	Neg	>190
P 17	8	Pos	4,606	Pos	>190
P 18	8	Pos	4,738	Pos	>190
P 19	8	Pos	5,776	Pos	>190
P 20	9	Pos	3,973	Pos	172

Det ble analysert ulike grupper med prøver for å se på flere aspekter ved analysen. Tabell 6 tar for seg 6 prøver som tidligere har blitt negative på screeningmetoden Liaison. Dette er for å teste VirClia med antatt negative prøver. Resultatene viser like verdier med begge metodene.

Tabell 6: IgM antistoff mot Borrelia undersøkt vha. Line Blot og VirClia. Prøver tidligere negative på Liaison XL.

ID	Målt verdi Line Blot poeng	Pos/Neg/Borderline Line Blot	Målt verdi (index) VirClia	Pos/Neg/Borderline VirClia	Tidligere verdi målt med Liaison AU/ml
N 1	0	Neg	0,266	Neg	10
N 2	0	Neg	0,022	Neg	0
N 3	0	Neg	0,061	Neg	4
N 4	Manuell avlesning	Neg	0,072	Neg	5
N 5	0	Neg	0,122	Neg	9
N 6	0	Neg	0,237	Neg	4

De eneste prøvene som undersøkes som kan sies å ha et fasitsvar er SLP og driftskontroll. Begge disse er forklart nærmere under 2.1 Prøvemateriale. Tabell 7 har oversikten over resultatene for disse prøvene 10 SLP og 1 driftskontroll. 2/11 av resultatene stemmer ikke overens mellom blot og VirClia. 18,2% avvik. 2/11 av resultatene på VirClia avviker fra verdiene fra fasiten som fortsatt utgjør 18,2% avvik.

Tabell 7: IgM antistoff mot Borrelia undersøkt vha. Line Blot og VirClia. Positive prøver fra SLP og intern DK.

ID	Målt verdi Line Blot poeng	Pos/Neg/Borderline Line Blot	Målt verdi (index) VirClia	Pos/Neg/Borderline VirClia	Fasit verdi AU/ml
P-SLP 1	9	Pos	6,567	Pos	378
P-SLP 2	8	Pos	0,691	Neg	38
P-SLP 3	9	Pos	2,923	Pos	82
P-SLP 4	8	Pos	0,679	Neg	32
P-SLP 5	9	Pos	2,251	Pos	57
P-SLP 6	14	Pos	4,049	Pos	190 (OBS! er maks måleområde på Liaison)
P-SLP 7	8	Pos	2,054	Pos	60
P-SLP 8	9	Pos	2,599	Pos	81
P-SLP 9	9	Pos	2,721	Pos	71
P-SLP 10	12	Pos	1,481	Pos	35
DK	8	Pos	2,618	Pos	60,2

Totalt er det analysert 59 prøver og 13 av prøveresultatene avviker mellom VirClia og Line Blot. Dette utgjør et avvik på totalt 22%. En annen måte å se resultatene i sammenheng på er å telle alle positive prøver på LineBlot uavhengig av type prøve (29 prøver totalt) og se hvor mange av dem som ble negative/borderline på VirClia (5 prøver).  $5/29 = 17\%$  avvik. 4 var negative og 1 var borderline. Dvs.  $4/29 = 14\%$  mulig falske negative. Det samme gjøres for alle negative prøver på LineBlot (28 prøver) og hvor mange som ble positive/borderline på VirClia (5 prøver) som gir et 18% avvik. 4 var positive og 1 var borderline. Dvs.  $4/28 = 14\%$  mulig falske positive. Avviksprosenten kommer uansett over grensen på 10%. Det kan derimot være flere årsaker til sprikende prøvesvar.

## 4.0.0 Diskusjon

Hensikten med oppgaven er å sammenligne målingen av IgM antistoff mot *Borrelia* på VirClia og Line Blot fra recomLine. Målet er å se om VirClia kan erstatte Line Blot som analysemetode. For å kunne fullstendig bytte ut Line Blot med VirClia kan den nye metoden ikke være mindreverdig den opprinnelige metoden. Oppgaven har sett på både de positive og de negative resultatene på Line Blot og avvikene på VirClia målt på de samme prøvene. På både positive og negative prøver er det respektivt 14% avvik som potensielt kan være falskt pos/neg svar på Line Blot forutsatt at VirClia har analysert rett. Bordelineresultater regnes ikke med her. Dette er over tillatte feilmargin på 10% og basert kun på dette ville det blitt anbefalt å beholde nåværende analyse. Likevel er verken Liaison, Line Blot eller VirClia en fasitverdi, og rene prosentverdier er ikke det eneste som avgjør om analysen byttes ut.

Det er 4 prøver som ble positive på Line Blot og negative på VirClia: SLP 2, SLP 4, PSNB 5 og P-SY 6. Etersom de to SLP prøvene har fasitverdier som positive går vi ut ifra at disse er reelle positive på Line Blot, altså gir VirClia falskt negativt resultat i dette tilfellet. De to andre negative avvikene er mer usikre. Prøve PSNB 5 har tidligere blitt målt som negativ på Line Blot før oppgaven begynte og burde blitt det nå også med tanke på at prøven ikke kan være eldre enn ett år. Det antas at VirClia har det korrekte resultatet, da Line Blot avviker fra tidligere resultater. Den siste prøven som ble positiv på Line Blot og negativ på VirClia var P-SY 6, den var positiv for syfilis og skulle i teorien ha blitt negativ for *Borrelia*. Prøven ble også negativ på Liaison da den ble målt til 12,6 AU/ml som tilsvarer negativt resultat. Dette er med på å støtte antagelsen om at prøven egentlig er negativ. Det er ikke 100% sikkert at den syfilispositive pasienten ikke har antistoff mot *Borrelia*-bakterien i tillegg, men det antas at VirClia gir det riktige resultatet i dette tilfellet.

En feilkilde i AU/ml resultatet for P-SLP 6; 190 AU/ml er at dette er maksverdien på Liaison. Dermed kan ikke et spesifikt svar oppdrives. P-SLP 1 f.eks. er fortynnet og ganget opp slik at resultatet blir spesifikt selv >190, samme som P-SLP 6 skulle ha blitt. Selv om vi ikke har den spesifikke tallverdien, er det positive svaret fortsatt gjeldene. Resultatene for SLP er resultatet fra Liaison ettersom vi ikke har tilgang til andre sykehus sine resultater.

De 4 prøvene som ble negative på Line Blot og positive på VirClia må også sees nærmere på: PSNB 15, PSNB 16, P 4 og P 10. Prøve PSNB 15 og 16 har tidligere blitt analysert på Line Blot som negative, og var forventet å bli negative igjen. PSNB 15 hadde et Liaison resultat på 40 AU/ml som er akkurat på grensen til å bli sterk positiv, likevel er sammenligningen mellom VirClia og Line Blot så ideelt skulle disse to prøvene blitt negative. Med ingen åpenbare feilkilder blir konklusjonen at VirClia sannsynligvis har gitt et falskt positivt resultat. P 4 og P 10 var derimot sterkt positive på screeningmetoden (Liaison) med resultat på 98 og >190 burde prøvene i teorien blitt positive på begge analysene. Etersom VirClia er i overenstemmelse med den etablerte screeningmetoden går vi i dette tilfellet ut ifra at VirClia har sant resultat.

Det er 2 prøver som ble borderline på Line Blot og begge ble positive på VirClia: PSNB 1 og P 3. Ved bruk av Line Blot kan bakgrunnsfarging på stripsen utgjøre interferens og dette kan sees på en av prøvene i gruppen PSNB. Prøve PSNB 1 på blot ble lest av som grenseverdi, trolig grunnet mye bakgrunns farging som fanges opp som svake utslag av skanneren. Prøven er trolig negativ på blot som den også skulle være, men ettersom prøven er målt til positiv på VirClia er dette et avvik. Den andre grenseverdi prøven som ble positiv på VirClia er P 3. Denne var sterkt positiv på Liaison med resultat på >19AU/ml, positiv på VirClia og grenseverdi på Line Blot. Ut ifra disse målingene antas det at prøve P 3 er positiv for antistoff mot *Borrelia*, og VirClia har målt rett resultat her.

P16 ble negativ på både VirClia og Line Blot som ikke registreres som et avvik, derimot er det verd å nevne at samme prøve ble sterkt positiv på Liaison med > 190AU/ml. Line Blot er mer sensitiv enn Liaison og vi stoler mer på det resultatet, spesielt når VirClia har fått samme resultat. Likevel er det ingen god forklaring på så forskjellig resultat mellom screeningmetoden og de to andre metodene. Etersom VirClia og Line Blot er enige og er mer sensitive enn Liaison går vi ut ifra at Liaisonresultatet er en falsk positiv.

P7 ble borderline på VirClia og positiv på Line Blot. Samme prøve testet sterkt positivt på Liaison med 153AU/ml. Etersom VirClia ga en indeks på 1,100 er den helt i øvre grense av grenseverdiresultater. Med et sterkt positivt svar fra Liaison, et positivt svar fra Line Blot og en grenseverdi som grenser til positiv på VirClia, gir dette grunnlag for å konkludere med at prøven

er positiv for antistoff mot *Borrelia*. Denne prøven kommer heller ikke med i avviksstatistikken da alle testene var nært positivt resultat.

Med tanke på kryssreaksjoner ble det analysert prøver positive for syfilis på begge metodene, ettersom syfilisbakterien er morfologisk beslektet med *Borrelia*-bakterien. Alle disse ble negative på VirClia som tyder på liten fare for kryssreaksjon da metoden ikke misoppfattet en liknende bakterie som positiv for IgM antistoff mot *Borrelia*. En av de syfilis positive prøvene ble positiv for antistoff mot *Borrelia* på Line Blot. Dette avviker fra samme prøve analysert på VirClia. Det finnes ikke nok grunnlag for å si om denne pasienten i tillegg til syfilis også har antistoff mot *Borrelia* da det ikke ble fanget opp av den nye metoden. Enten gir den gamle metoden i dette tilfellet et falskt positivt resultat som følge av en kryssreaksjon, eller så har pasienten antistoff mot *Borrelia* i tillegg og VirClia oppdaget det ikke. Hva som er mest sannsynlig avhenger av pasientens symptomer og sykdomshistorikk som ikke er tilgjengelig for denne oppgaven.

I denne oppgaven ble det analysert noen prøver med sikre svar og noen mer usikre. Ettersom de negative prøvene ble negative på både den etablerte screeningmetoden og dagens metode (Line Blot) ser oppgaven på disse som sikre negative. Det er verd å nevne at prøve N 4 måtte leses av manuelt da skanneren ikke fungerte optimalt. Dette gir en liten usikkerhet da skanneren kan oppdage et positivt resultat på stripsen som ikke sees like lett med det blotte øyet. De andre prøvene som sies å ha fasitverdi er SLP og DK. VirClia var negativ på 6 av 6 på de sikre negative og positiv på 9 av 11 på de sikre positive. Dette gir et sammenlagt avvik på 2/17 som utgjør 12% avvik fra sikre resultater.

Det ble satt en grense på <10% avvik for å godkjenne analysen. Avviksprosenten for prøvene med fasitverdier er på 12% og kommer over tillat avvik. Dette er derimot ikke langt over grensa, og med så få prøver kan vi ikke være sikre på at vi får et reelt bilde. 59 prøver er ikke mye, og hvert avvik vil utgjøre en høy prosentandel, spesielt når oppgaven kun benytter 17 prøver med sikre fasitverdier. Når det gjelder prøvene uten fasit, er flere av avvikene diskutert tidligere i diskusjonen. Selv om Line Blot er den etablerte metoden er den ikke en fasit og flere av avvikene er vurdert til fordel for VirClia.

Det er også andre faktorer som avgjør om det er verd å bytte analysemetode. Det hviler ikke bare på analytisk riktighet, men også på f.eks. tid og ressursbruk. VirClia er enklere, raskere og kan benyttes daglig. Det reduserer risikoene for feilkilder som kommer med manuelle metoder med tanke på at et instrument vil gjøre analysen helt likt hver gang i motsetning til mennesker. På VirClia kan IgM antistoffer mot *Borrelia* analyseres samtidig med andre analyser som også er tidsbesparende. Noen av disse egenskapene kan veie opp dersom det skulle vise seg at VirClia gir mer usikre svar. Det kliniske er den viktigste delen av å stille diagnosen Borreliose. Analysering av antistoff mot *Borrelia* er kun et hjelpemiddel og kan ikke brukes alene. Derfor kan en noe forhøyet avviksprosent tolereres dersom det vurderes at andre egenskaper veier opp for dette. Avgjørelsen om metoden skal byttes ut vil til slutt være opp til fagpersoner.

## 5.0.0 Konklusjon

I dette prosjektet ble det kun benyttet 59 prøver som i utgangspunktet er for lite til å gi et ordentlig sammenligningsgrunnlag. Dersom en pålitelig sammenligning er ønskelig anbefales det å teste et større prøvevolum. Det vil til slutt uansett være opp til fagpersoner om bytte skal gjennomføres.



## 6.0.0 Referanser

1. Fakta om flått [Internett]. Flåttsenteret. 2023 [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://flattsenteret.no/flatt/>
2. Soleng A. Skogflått (flått) [Internett]. FHI Folkehelseinstituttet. 2019 [sitert 11. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/skadedyrveilederen/edderkopper-og-midd/skogflatt/#skogflaatt-som-smittespreder>
3. Ocampo JMF, Jore S, Andreassen ÅK, Wiklund BS, Dudman S, Ottesen P, mfl. Flått og flåttbårne sykdommer i 2015 [Internett]. Nasjonalt folkehelseinstitutt; 2016 jul [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2015/arsrapport-flattbarne-sykdommer-2015.docx.pdf>
4. Brorson Ø. Borrelia burgdorferi – en unik bakterie. Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 22. oktober 2009 [sitert 10. mars 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2009/10/oversiktsartikkel/borrelia-burgdorferi-en-unik-bakterie>
5. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JWR, mfl. Lyme borreliosis. 2. august 2017;44.
6. Brisson D, Drecktrah D, Eggers CH, Samuels DS. Genetics of Borrelia burgdorferi. Annu Rev Genet. 4. september 2012;46:515–36.
7. Borreliose [Internett]. 2019 [sitert 10. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/infeksjon-og-betennelse/borreliose/>
8. Ljøstad U, Mygland Å. Lyme-borreliose hos voksne. Tidsskr Den Nor Legeforening. 15. mai 2008;(128):1175–8.
9. Mygland Å. Kan det være Lyme-nevroborreliose? Tidsskr Den Nor Legeforening. 24. januar 2017;137:86.
10. Amy L Ross Russell, Matthew S Dryden, Ashwin A Pinto, Joanna K Lovett. Lyme disease: diagnosis and management. Pract Neurol. 1. desember 2018;18(6):455.
11. Cadavid D, Auwaerter PG, Rumbaugh J, Gelderblom H. Treatment for the neurological complications of Lyme disease. Cochrane Libr [Internett]. 8. desember 2016; Tilgjengelig på: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463975/?fbclid=IwAR087d9RkZqJ7Uo1R\\_oIOOpJDou1uf7enJ1EmMygktsToMHCg93GLBYPDnM](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463975/?fbclid=IwAR087d9RkZqJ7Uo1R_oIOOpJDou1uf7enJ1EmMygktsToMHCg93GLBYPDnM)
12. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 7. utg. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. 118 s.
13. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG. Menneskekroppen. 2. utg. Gyldendal; 2016. 46 s.

14. Farnoud AM, Toledo AM, Konopka JB, Del Poeta M, London E. Lipid Domains [Internett]. Bd. 75. ScienceDirect; 2015 [siteret 13. april 2023]. 233–268 s. Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5023442/>
15. Casjens S. *Borrelia* genomes in the year 2000. J Mol Microbiol Biotechnol. november 2000;2(4):401–10.
16. Fischer JR, Parveen N, Magoun L, Leong JM. Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. PNAS. 28. mai 2003;100(12):7307–12.
17. Stevenson B, von Lackum K, Wattier RL, McAlister JD, Miller JC, Babb K. Quorum sensing by the Lyme disease spirochete. ScienceDirect. september 2003;5(11):991–7.
18. Coleman JL, Roemer EJ, Benach. Plasmin-Coated *Borrelia burgdorferi* Degrades Soluble and Insoluble Components of the Mammalian Extracellular Matrix. Infect Immun [Internett]. 1. august 1999;67(8). Tilgjengelig på: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96674/?fbclid=IwAR39zU8tCoSdAHRRf1XII-mCzgmCDFZYZ1BjN31DHrs7Winpr9jKQX\\_TPgE](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96674/?fbclid=IwAR39zU8tCoSdAHRRf1XII-mCzgmCDFZYZ1BjN31DHrs7Winpr9jKQX_TPgE)
19. Hellwage J, Meri T, Heikkila T, Alitalo A, Panelius J, Lahdenne P, mfl. The Complement regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem. mars 2001;276(11):8427–35.
20. Lyme borreliose - veileder for helsepersonell [Internett]. FHI Folkehelseinstituttet. 2022 [siteret 11. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/lyme-borreliose---veileder-for-hels/>
21. Statistisk årbok 2013 tabell: 125 Meldte tilfelle av infeksjonssykdommer [Internett]. Statistisk sentralbyrå. 2013. Tilgjengelig på: <https://www.ssb.no/a/aarbok/tab/tab-125.html>
22. Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. Natl Inst Health. juni 2008;22(2):217–34.
23. Porcella SF, Schwan TG. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. J Clin Invest. mars 2001;107(6):7.
24. Borne V, Borne W. Molecular characterization of ‘*Candidatus Borrelia tacyglossi*’ (family Spirochaetaceae) in echidna ticks, *Bothriocroton concolor*. Int J Syst Evol Microbiol. 5. mai 2017;67(4):1075–80.
25. Burtis CA, Burns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7. utg. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2015. 233 s.
26. Skarpaas T, Quarsten H, Noraas S. Analysemetoder for påvisning av Lyme berreliose [Internett]. Flåttsenteret; [siteret 19. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://flattsenteret.no/wp->

content/uploads/2015/05/Analysemetoder-p%C3%A5visning-Lyme-borreliose-Mikrobiologisk-laboratorium-S%C3%B8rlandet-Sykehus-2013.pdf

27. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *ScienceDirect*. oktober 2015;72:4–15.
28. VirClia Monotest [Internett]. Produkt presentasjon presentert på; [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: [https://en.vircell.com/media/filer\\_public/88/fc/88fca40b-2564-46a7-8112-7f8255618827/virclia\\_pme015-0319\\_-\\_intl.pdf](https://en.vircell.com/media/filer_public/88/fc/88fca40b-2564-46a7-8112-7f8255618827/virclia_pme015-0319_-_intl.pdf)
29. recomLine Borrelia IgG/IgM [Internett]. MikroGen Diagnostik. [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.mikrogen.de/english/products/product-overview/testsystem/borrelia-igg-1.html>
30. Forus A. Hva slags rolle har ulike proteiner i cellen? *Tidsskr Den Nor Legeforening*. 12. juni 2012;(132):1322.

## 7.0.0 Vedlegg

Vedlegg 1: Liaison XL daglig drift

Vedlegg 2: Manuelt borrelia blot IgM/IgG (recomLine)

Vedlegg 3: VirClia: Daglig drift, AMM

Vedlegg 4: DiaSorin LIAISON Borrelia IgM Quant

Vedlegg 5: BORRELIA VIRCLIA IgM MONOTEST

Vedlegg 6: Pakningsvedlegg recomLine Borrelia IgM

Vedlegg 7: Sikkerhetsdatablad TMB Substratløsning for recomLine / recomBlot

Vedlegg 8: Eksempel på montering av strips på Line Blot

Vedlegg 9: Eksempel på resultatutskrift fra Line Blot

Vedlegg 10: Borreliaserologi – tolkning av resultater

**Liaison XL dagligdrift.**

Forfatter: Bente Hagh  
Godkjent av: Vibeke Lystad

Gyldig fra: 13.10.2021  
Revisjonsfrist: 13.10.2023

Revisjon: 1.4  
ID: 32658

**Hensikt**

Prosedyren beskriver daglig drift og vedlikehold av LIAISON@XL helautomatisk kjemiluminescens-instrument. Prosedyren skal sikre at instrumentet blir brukt på riktig måte og at vedlikehold blir gjort etter fastsatte prosedyrer. Prosedyren sikrer at sporbarhet av kontroll og reagens lot opp mot hver prøve blir ivarettatt.

Prosedyren gjelder bioingeniører som analyserer prøver på LIAISON XL,

Og gjelder alle som skal kjøre LIAISON XL med online funksjon.

Instrument nummeret i analytisk plattform(ANP) er 02

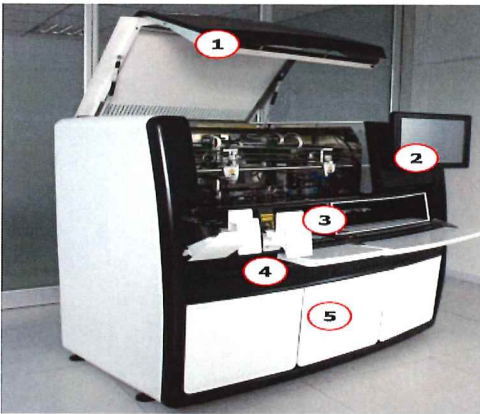
**Kort beskrivelse av LIAISON XL**

LIAISON@ XL er et helautomatisk kjemiluminescens-instrument som brukes til hele prøvebehandlingen her under prøvafortynning, dispensering av prøver og reagenser, inkubasjoner, vaskeprosesser, samt måling og evaluering. Instrumentet kontrolleres via PC-programvaren.

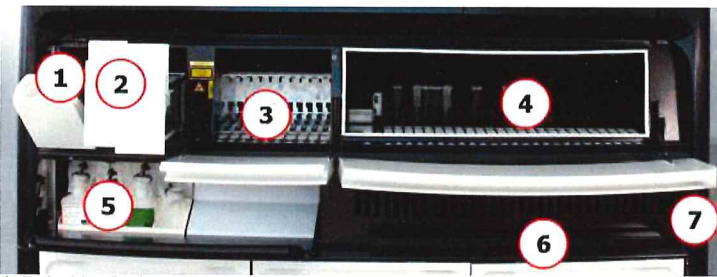
Denne programvaren som ble laget spesielt for dette formålet, lar brukeren behandle de forhåndsdefinerte analysene. Disse analyseprotokollene hentes på nettet ved å opprette bruker på diasorin.com. Ved å taste inn lot nummer for de aktuelle analysene kommer den opp. Deretter laster man ned protokollen på en lokal USB-enhet, og overfører dem til instrument programvaren når instrumentet står i Klar eller ventemodus.

Den klare strukturen med intuitiv brukerveiledning på berøringsskjerm gjør det lett å utføre de daglige rutinejobbene raskt.

Instrument:



1. Frontdeksel
2. Berøringsskjerm
3. Innlastingsområde for kyvetter, skuffer for engangsspisser og innlastingsområde for prøver og reagenser
4. Område for starterreagenser
5. Skap for væskebeholdere.



1. Beholder for kyvetter
2. Skuffer for holdere med engangsspisser
3. Innlastingsområde for prøvestativ
4. Innlastingsområde for reagenser (integraler og bireagenser)
5. Område for starterreagenser
6. Uttrekkbart bord
7. Integreert verktøy for resuspensjon

Skap for væskebeholdere:

## Manuelt: Borrelia Blot IgM/ IgG (recomLine),AMM

Forfatter: Tove Kristin Ude  
Godkjent av: Vibeke Lystad

Gyldig fra: 28.06.2022  
Revisjonsfrist: 27.06.2027

Revisjon: 2.7  
ID: 18694

## Hensikt og omfang

Hensikten med prosedyren er å være en hjelp for bioingeniøren som skal sette opp Borrelia recomLine IgM og IgG. Prosedyren beskriver BLOT satt opp på AUTOBLOT3000. Ved manuelt oppsett av serum brukes samme prosedyren bare at da må de ulike trinnene utføres av bioingeniøren. Prosedyren gjelder alle som utfører screening og utvidet Borrelia serologi.

## Grunnlagsinformasjon

Prøver som tester positivt eller grenseverdi på Borrelia IgM og/eller IgG kan etter vurdering av lege bli etterrekvirert på Borrelia recomLine. Dette er en spesifikk test der en bruker en test-strip med separerte antigener langs stripen slik at en kan identifisere spesifikke antistoffer mot Borrelia burgdorferi.

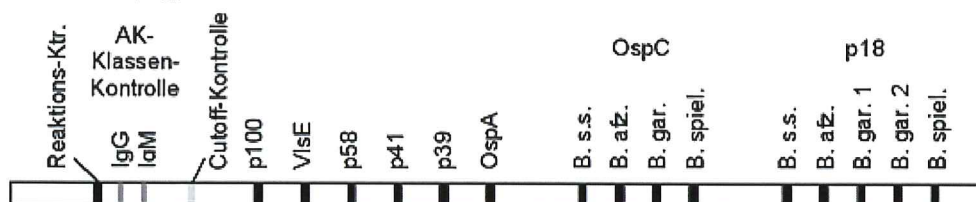
## Prinsipp

Er en strimmel-immunoassay med antigen fremstilt ved hjelp av rekombinante teknikker for påvisning av IgG- eller IgM-antistoff mot Borrelia burgdorferi i serum, plasma eller CSF hos mennesker. RecomLine Borrelia IgM og IgG er en test der rekombinante proteiner appliseres i en nitrocellulosemembran. Denne blir festet til en strip. Hver strip inneholder også interne kontroller for å minske risikoen for falske negative og for å bekrefte at serum og konjugat er tilsatt.

Sammenlignet med screeninganalyser har recomLine Borrelia økt sensitivitet og spesifisitet, og brukes som oftest til å bekrefte resultatene fra enzymimmunoassayer.

I testen benyttes svært spesifikke, genetisk manipulerede immundominante Borrelia-proteiner.

Det er kun recomLine Borrelia som kan påvise antistoff mot alle de fem immunopatogene genotypene vi kjenner til så langt (B. burgdorferi sensu stricto, B. garinii, B. afzelii, Borrelia spielmanii og B. bavariensis), gjennom én enkelt test.



Det første båndet på stripen under strip nr er serum kontroll og bånd nr 2 er antistoff klasse kontroll slik at en ser at riktig konjugat er tilsatt stripen. Det er også en cut-off kontroll på stripsen som er bånd nr 3 der intensiteten på fargen på båndet definerer cut-off for den aktuelle stripen.

## Arbeidsbeskrivelse

Prøvemengde: serum: 40 µl IgM, 20µl IgG,  
Spinalvæske: minst 100µl IgM, 50µl IgG

Analysemateriale: Serum, plasma eller spinalvæske.

## Reagenser

recomLine Borrelia IgM/IgG blot:

Oppbevaring: +2/+8, kjølerom nr 232.05.009.

Leverandør: Aiden

Produsent: Mikrogen Diagnostik

Produktnavn: recomLine Borrelia IgM/IgG

**VirClia: Daglig drift, AMM**

Forfatter: Tove Kristin Ude  
Godkjent av: RPA Systembruker

Gyldig fra: 03.12.2020  
Revisjonsfrist: 02.12.2025

Revisjon: 1.1  
ID: 42806

**Hensikt og omfang**

Prosedyren gjelder alle som skal gjennomføre oppstart, vedlikehold, analysering, behandle svar og avslutte VirClia etter bruk.



Figur 1

**Kort beskrivelse av instrumentet**

VirClia er en helautomatisk ELISA prosessor for mikroplateanalyse.

Systemet har en kapasitet på opptil 12 tester pr. plate. Dette er inkludert kontroller. Instrumentet har plass til to plater

**Prøverack**

Prøvestativene vil automatisk registrere hvor en prøven settes. De tre prøverackene kan ta opptil 192 prøver til sammen. Rackene kan ta rør med tre forskjellige størrelser: 12, 13 eller 16 x 75 mm. Det kan også bestilles rack som er tilpasset en annen størrelse. Rackets posisjon er nummerert slik: Rack 1 er fremst til høyre, rack 2 er fremst til venstre og rack tre er bak til venstre. Her settes prøvene fortløpende fra øvre venstre hjørne.

**Reagensrack**

Racket har 16 posisjoner og aksepterer reagensflasker mellom 22-35 mm. Det kan også bestilles rack som er tilpasset en annen størrelse.

Både prøverack og reagensrack-stativet er plassert på et glidebrett for maksimal tilgjengelighet.

**Mikrotiterplateholder**

Det er plass til to mikrotiterplater på holderen og det er en plass til fortynningsplate.

**Kamera**

Det er festet et kamera på proben som viser nåtid og muliggjør ekstern feilsøking.

**Probe**

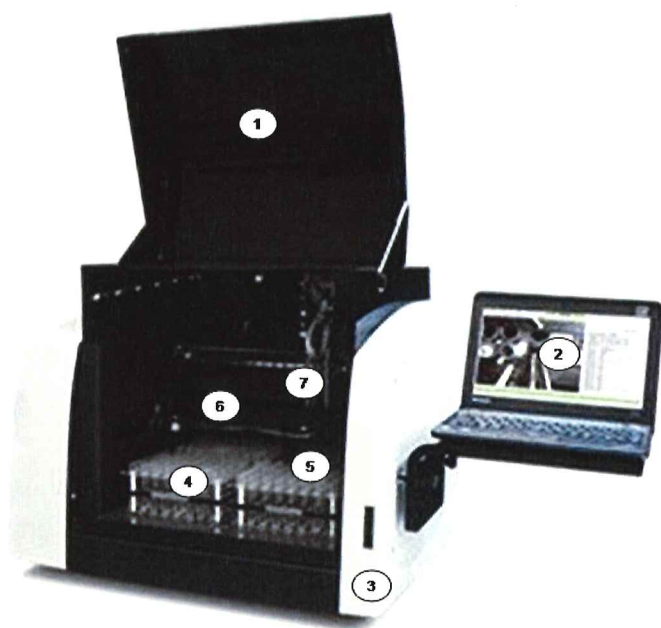
VirClia benytter singel probe med dobbel nål. Nåla kan pipetere volum mellom 1 µl -300 µl. Den kan pipettere 1 µl med mindre enn 3% presisjon.

**Inkubator**

Max. varme er 45°C. Det er plass til to plater.

**Avleser**

Benytter standard bølglengde: 405, 450, 490, 550 og 630 nm. For annen bølglengde må dette bestilles.



Figur 2

1. System Cover.
2. Laptop PC.
3. Barkodeskanner.
4. Prøverack.
5. Reagensrack.
6. Plass for mikrotiterplate.
7. Probe. Nålen har montert kamera.

I tittelfanen (øverste del av skjermen) er det ikoner som forteller om vaskeflasken har væske eller om avfallsflasken er full:



Under tittelfanen ligger arbeidsfanen:

Worklist Samples Racks Microtiter Plates Tools

#### Worklist

- Legge inn analysenavn og operatørnavn.
- Starte analysering.
- Se og skrive ut rapporter.
- Sende prøvesvar manuelt til LIS

#### Samples

- Scanne inn prøver.
- Legge inn prøver manuelt.
- Hente arbeidsordre fra LIS
- Etterbestille tester på prøver.

#### Racks

- Visualisere hvor prøvene er.
- Plassering av reagenser.

#### Microtiter Plates

- Legge til strips.
- Lagrer lotnummer og exp. Dato

#### Tools

- Tekniske tjenester
- Daglig vedlikehold
- Kalibreringer
- Finne hjemmeposisjon.
- 

#### Fortynninger

Fortynning av prøver foregår i hver strip. Noen tester benytter en ekstra mikrotiterplate til forfortynning, eks. Dengue IgM.

#### Avlesning

Mikrotiter platen avleses i absorpsjonsmodulen på de ulike testene etter de programmerte beregningene.

#### Rapporter

For hver analyse genereres en PDF-fil og en tilknyttet ren tekstfil som tilsvarende loggfilen og lagres automatisk.  
C: \ Bruker \ Offentlige \ Dokumenter \ Thunderbolt EIA \ Arbeidslisterapporter.

Organiseringen av informasjonen i C: \ User \ Public \ Documents \ Thunderbolt EIA er følgende:



- Tester: hvor testene holdes.
- Feil: når det oppstår en feil, genererer programvaren en ren tekstfil (feillogg) som er lagret i denne mappen, og den inneholder informasjon om årsaken til feilen.
- ManualReadData: manuelle lesinger lagres i denne mappen.
- Arbeidslisterapporter: den lagrer rapportene i PDF-filer med tilhørende loggfil
- Arbeidslister: den lagrer arbeidslistene og XML-filene.
- Andre mapper: ReportTemplates, WorklistExportXLSX, LISLogging.

En annen måte å gå gjennom eller gjenopprette rapportene på er ved hjelp av programvaren. For å gjøre det, gå til kategorien Worklist og velg alternativet LOAD.

- Velg arbeidslisten, så blir resultatene lastet automatisk.
- Det neste vinduet vises for å fortelle deg at du er ansvarlig for lastning av prøverørene.
- Hvis du vil visualisere resultatene, trykker du Show Report.
- Hvis du vil sende resultatene til LIS igjen, trykker du Send Results to LIS.

[tilbake](#)

### Egenskaper

VirClia kan analysere forskjellige tester på samme plate, da testene for Virclia har samme protokoll.

- Ulike analyser kan analyseres på samme plate så lenge de har samme protokoll. ELISA-prosessoren kan analysere 1 analyse pr. strip og opptil 12 analyser pr. plate.
- Pr. kjøring tar maskinen maksimalt 2 mikrotiterplater (mtp).
- Lite krevende daglig vedlikehold.

### Ansvar

Bioingeniøren som har VirClia som sitt arbeidsområde.

### Arbeidsbeskrivelse

[Vedlikehold](#)

[Rapporter](#)

[Verktøy/ tools](#)

### Fremgangsmåte

#### Reagenser

Produktnavn: VIRCLIA<sup>®</sup> AUXILIARY REAGENTS COMPONENT KIT  
 Oppbevaring: 2-8 °C i kjøleskap: 05.022.015, rom nr 232.05.022  
 Åpnet kit i samme kjøleskap.  
 Holdbarhet: 2-8 °C til utløpsdato i kjøleskap: 232.05.022  
 Oppbevares i vannrett stilling.  
 Innhold: WASHING SOLUTION  
 DECONTAMINATION SOLUTION

Vaskebuffer fra VIRCLIA<sup>®</sup> WASHING SOLUTION fra auxiliary component kit  
 VIRCLIA<sup>®</sup> AUXILIARY REAGENTS må lages før bruk. 50 ml av vaskebuffer (20x) fortynnes i 950 ml dest. vann. Etter fortynning er vaskebufferen holdbar i 2 uker. Vaskebufferen skal ha romtemperatur før bruk. La stå ca 1 time i romtemperatur før bruk.  
 Ved krystaller i vaskebufferen før fortynning varmes flasken med konsentrert vaskebuffer til 37 °C slik at krystallene løser seg opp før fortynning.  
 For mer info, se perm for kit vedlegg.

### Før oppstart

*Instrumentet må primes med vaskebuffer før et oppsett.*

Ta frem kit til de analyser som skal settes opp slik at de får romtemperatur.

Lag vaskebuffer om nødvendig. Vaskebuffer fortynnes 1:20, 50 mL konsentrert vaskebuffer fortynnes i 950 mL dest. vann. Vaskebuffer er holdbar en uke i romtemp. Hvis vaskebuffer oppbevares kjølig kan det ta 3,5 timer å oppnå romtemp.

1. Slå på styrings-PC (knapp på siden).
2. Plasser nivåsensor i flasken med vaskebuffer og tøm wasteflasken.



Figur 3



3. Dobbeltklikk  og instrumentet initialiserer.



DiaSorin S.p.A.  
Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) - Italy  
www.diasorin.com  
Tel. +39.0161.4871



Endringer: §1, §2, §4, §14.2, §15, §17.1, §17.2, §17.3, §17.4, Referanser;  
Slettinger: §3, §14.1;

## LIAISON® Borrelia IgM Quant (REF 310020)

### 1. BRUKSOMRÅDE

LIAISON® Borrelia IgM Quant-analysen bruker kjemiluminescens-immunoanalyse (CLIA) for kvantitativ bestemmelse av spesifikke IgM-antistoffer mot *Borrelia burgdorferi sensu lato* (inkludert stammene *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*) i prøver av humant serum, plasma eller spinalvæske (CSF). Testen må utføres på LIAISON® Analyser-familien.

### 2. SAMMENDRAG OG BESKRIVELSE AV TESTEN

Bakterien *Borrelia burgdorferi*, som ble oppdaget i 1982, er etiologisk agens til Lymes borreliosis, en sykdom som overføres av ulike flåttarter av Ixodes-typen. Lymes eller Borrelia er en multisystemisk lidelse som kan angripe flere ulike organer, så som huden, nervesystemet, større ledd, og de kardiovaskulære systemet. Selv om Lymes sykdom setter i gang en kraftig immunreaksjon, vil *Borrelia*-bakterien overleve og fortsatt være i sirkulasjon hos infiserte pasienter. På samme måte som ved syfilis, går Lymes borreliose gjennom flere ulike kliniske stadier, fra tidlig til sen infeksjon:

- 1. stadium: hudskade på stedet der flåtten har bitt; tidlig infeksjon med lokal eksemreaksjon (erythema chronicum migrans, EM) deretter kan infeksjonen spre seg dersom den ikke blir behandlet.
- 2. stadium: neurologiske lidelser (nevroborelliose).
- 3. stadium: artritt, kan observeres flere år etter infeksjonen.

Likheten mellom de kliniske symptomene til Lymes borreliose og andre sykdommer som ikke har noen sammenheng med Lymes, utgjør et diagnostisk problem på grunn av mange ulike og varierende utslag. Å stille diagnosen borreliose kan være vanskelig på bakgrunn av kliniske funn, spesielt dersom det mangler sykehistorie om flåttbitt eller utslett (erythema chronicum migrans). I tillegg kan sykdommen være uten symptomer til den når senere stadier. Når erythema chronicum migrans ikke er tilstede, kan de kliniske tegnene til humant granulocytic ehrlichiosis (HGE) – når de oppstår i de samme flåttinfiserte områdene der borreliose blir rapportert – lett forveksles med tegnene på Lymes borreliose.

Som en konsekvens av dette er klinikerne avhengig av antistoffpåvisning for å bestemme sykdomsårsaken. Bruken av helcelle sonikert (ultralydbehandlet) *Borrelia burgdorferi* kan gi vel dokumentert falske positive resultater på grunn av kryssreaksjoner med spesifikke antistoffer med proteiner som har stor likhet med mange bakterielle patogener, spesielt *Treponema pallidum*, som er den etiologiske agens for syfilis. Diagnostiske tester som bruker bakterielysat slik som antigen, selv fra andre arter av *Borrelia burgdorferi*, vil ofte mislykkes i forsøket på å oppnå klare resultater i de tidligere stadiene av infeksjonen.

LIAISON® Borrelia analyse bruker spesifikke rekombinante antigen som utvinnes fra *E. coli*, for å øke nøyaktigheten ved diagnose av Lymes borreliose. LIAISON® Borrelia IgM-sett inneholder en fast fase belagt med det ytre overflateproteinet OspC, som er immunodominant for IgM-respons i den tidlige fasen av infeksjon, i tillegg til det nylig identifiserte *Borrelia*-antigenet VlsE (forkortet: variable major protein-like sequence, expressed = variabel primær proteinlik sekvens, uttrykt). LIAISON® Borrelia IgG inneholder kun *Borrelia* antigenet VlsE. VlsE er et eksternt overflate-lipoprotein som tenkes spille en viktig rolle i immunresponsen til Lymes. Det inneholder konserverte regioner (som fungerer som *in vivo* transmembrandomener), variable og ikke-variable regioner (den eksponerte utsiden av bakteriemembranet). De variable regionene går konsistent gjennom sekvensvariasjoner ved rekombinasjon under infeksjonen. Antigenisk variasjon på overflateeksponerte proteiner er identifisert som en viktig mekanisme for å omgå immunsystemet. Seks ikke-variable regioner (IR 1-6) er spredt innenfor det variable domenet, konservert blant stammer og genvarianter av *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex. I levende *Borrelia*-bakterer vil de ikke-variable regionene være maskert av de variable regionene, og dermed beskyttet mot direkte angrep fra immunsystemet til verten. *Borrelia*-bakterer blir prosessert av celler inneholdende antigen som utsetter proteiner for immunsystemet. Interessant nok er de ikke-variable regionene immunodominante i Lymes borreliose. Pasienter med Lymes utvikler gjennomgående en sterk antistoffreaksjon mot VlsE, i alle sykdommens stadier, inkludert de tidligste stadiene. Denne reaktiviteten, som kan oppdages ved Western blot, med bruk av rekombinant VlsE, er fraværende eller svekket i intensitet når helcelle-lysat fra lave passasjetall i *in vitro* framdyrket *Borrelia burgdorferi* brukes som antigen. Rekombinant VlsE er den best egnede markøren for laboratoriediagnose, både for tidlig og senere immunreaksjoner ved Lymes borreliose, og viser høy diagnostisk sensitivitet og spesifisitet.

Å oppdage spesifikke antistoffer mot *Borrelia burgdorferi* i spinalvæske er mer signifikant enn i serum eller plasma, og det blir tolket som bevis for intratekal-syntetiserte antistoffer (m.a.o., nevroborelliose) når evaluert sammen med andre laboratoriefunn.

### 3. ANALYSEPRINSIPP

Metoden for kvantitativ bestemmelse av spesifikke IgM-antistoffer mot *Borrelia burgdorferi* er en indirekte kjemiluminescens-immunoanalyse (CLIA). Magnetpartikler (fast fase) blir belagt med rekombinant antigen og et monoklonalt museantistoff er knyttet til et isoluminolderivat (isoluminol-antistoff-konjugat). Under den første inkubasjonen vil *Borrelia burgdorferi*-antistoffer som er tilstede i kalibratorer, prøver og kontroller, binde seg til den faste fasen. Under den andre inkubasjonen vil antistoff-konjugatet reagere med IgM mot *Borrelia burgdorferi* som allerede er bundet til den faste fasen. Etter hver inkubasjon fjernes det ubundne materialet med en vaskesyklus.

Deretter tilsettes startreagenser, og en rask kjemiluminescensreaksjon blir indusert. Lyssignalet, og dermed mengden isoluminol-antistoff-konjugat, blir målt ved hjelp av en fotomultiplikator som relative lysenheter (RLU). Dette anslår konsentrasjonen av *Borrelia burgdorferi*-IgM-antistoffer som finnes i kalibratorer, prøver og kontroller.

# BORRELIA VIRCLIA® IgM MONOTEST

## For *in vitro* diagnostic use

**VCM010:** Indirect chemiluminescent immunoassay (CLIA) to test IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi* in human serum/plasma. 24 tests.

### INTRODUCTION:

Lyme borreliosis is a tick-transmitted bacterial infection caused by some members of the spirochete group *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The *B. burgdorferi* complex comprises at least 15 genospecies worldwide. *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl) is the leading organism responsible for Lyme disease in Asia, Europe and in the United States.

The strains present in Europe are *Borrelia burgdorferi* sensu lato which groups *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* are pathogenic species. Potentially pathogenic species are *B. valaisiana* and *B. lusitanae* and, only in the United States, *B. burgdorferi* sensu stricto.

They can cause neurological and arthritic complications. Transmission of *B. burgdorferi* to humans occurs through a bite from an infected tick of the genus Ixodes.

The disease phases include an early localized stage (3 to 30 days post-tick bite), characterized by a red, expanding rash called erythema migrans (70-80% of infected patients); fatigue, chills, fever, headache, muscle and joint aches, and swollen lymph nodes can also be present. In the early disseminated stage (days to weeks post-tick bite) the infection may spread from the site of the bite to other parts of the body, producing an array of specific symptoms: additional rashes on other areas of the body, facial or Bell's palsy, neuroborreliosis, borreliac lymphocytoma, intermittent arthritis and carditis. Finally, in late disseminated stage (months to years post-tick bite) untreated patients may begin to have intermittent bouts of arthritis with severe joint pain and swelling; Up to 5% of untreated patients may develop chronic neurological complaints. Approximately 10-20% of patients with Lyme disease have symptoms that last months to years after treatment with antibiotics.

Laboratory tests are necessary to confirm a diagnosis of later stage infection. Antibodies to *B. burgdorferi* are usually detectable within 4-8 weeks of infection. Patients with late-stage infection are rarely seronegative and usually have very strongly positive antibody tests. However, the occurrence of false-positive tests in patients with other infections or conditions, such as autoimmune diseases, can lead to misdiagnosis and inappropriate treatment. A two-step testing approach is frequently advised, with an enzyme immunoassay for the first step, and Western blot for the second. Assays based on highly purified antigens are used to achieve maximal specificity.

Detection methods based on chemiluminescence have received much attention due to their low background, linearity and wide dynamic range. When coupled to enzyme immunoassays, the signal amplification effect provided by the enzyme enables the design of CLIA (ChemiLuminescent ImmunoAssay) tests with shorter incubation times while keeping or improving their sensitivity.

### PRINCIPLE OF THE TEST:

The CLIA method is based upon the reaction of antibodies in the sample tested with the antigen adsorbed on the polystyrene surface. Unbound immunoglobulins are washed off. An enzyme-labelled anti-human globulin binds the antigen-antibody complex in a second step. After a new washing step, bound conjugate is developed with the aid of a chemiluminescent substrate solution that will generate a glow-type luminescence that can be read with a luminometer.

### KIT FEATURES:

All reagents supplied are ready to use.

Serum dilution solution and conjugate are coloured to help in the performance of the technique.

Sample predilution is not necessary.

Reagents required for the run of the test are included in the monodose presentation.

### KIT CONTENTS:

1 VIRCLIA® BORRELIA IgM MONODOSE: 24 monodoses consisting of 3 reaction wells and 5 reagent wells with the following composition:

Wells A, B, C: reaction wells; wells coated with a combination of recombinant antigens from pathogenic species of *Borrelia afzelii* (OspC), *Borrelia garinii* (OspC, VlsE), *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (OspC), *Borrelia burgdorferi sensu lato* (p41i, p39, p17 and OspE) and *Borrelia spielmanii* (OspC).

Well D: Conjugate: orange; containing anti-human IgM peroxidase conjugate dilution and Neolone and Bronidox as preservatives.

Well E: Serum dilution solution: blue; phosphate buffer containing protein stabilizers, anti-human IgG and Neolone and Bronidox as preservatives.

Well F: Calibrator: clear; positive serum dilution containing Neolone and Bronidox as preservative.

Well G: Substrate component B: clear; containing peroxide.

Well H: Substrate component A: clear; containing luminol.

**Store at 2-8°C and check expiration date.**

### Materials required but not supplied:

-VIRCLIA® AUXILIARY REAGENTS (REF:VCMAR)

-Precision micropipettes 5 and 100 µl.

-Eight channel micropipette 100 µl.

-Adapted microplate washer.

-Thermostated incubator/water bath.

-Microplate luminometer.

-Alternatively, a CLIA automated processor.

### STORAGE REQUIREMENTS:

Store at 2-8°C. Do not use the kit reagents beyond the expiration date. This will be valid only if reagents are stored, closed and at 2-8°C.

### STORAGE OF REAGENTS ONCE OPENED:

Reagent	Stability
VIRCLIA® MONODOSE	Once opened, use it in the same day



**STABILITY AND HANDLING OF REAGENTS:**

Handle reagents in aseptic conditions to avoid microbial contaminations.

Do not let the plate dry between washing and reagent addition.

Substrate component A is light sensitive. Avoid light exposure. Substrate solutions should not get in contact with acid, combustible materials and strong oxidizing or reducing agents. Make sure that no metal components come in contact with the substrate without having previously tested their compatibility.

VIRCELL, S.L does not accept responsibility for the mishandling of the reagents included in the kit.

**RECOMMENDATIONS AND PRECAUTIONS:**

1. For *in vitro* diagnosis use only. For professional use only.
2. Use kit components only. Do not mix components from different kits or manufacturers. Only components of the AUXILIARY REAGENTS kit are compatible with all VIRCLIA® references and lots.
3. Clean pipette tips must be used for every assay step. Use only clean, preferably disposable material.
4. Wear protective disposable gloves, laboratory coats and eye protection when handling specimens. Wash hands thoroughly after manipulating samples. Besides, follow all safety protocols in use in your laboratory.
5. Do not use in the event of damage to the package.
6. Never pipette by mouth.
7. Serum dilution solution, reaction wells, conjugates and calibrator in this kit include substances of animal origin. Calibrator includes as well substances of human origin. Although the human serum controls of this kit have been tested and found negative for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Hepatitis C antibodies and Human Immunodeficiency Virus antibodies, control sera and patient specimens should be handled as potentially infectious. Reaction wells are coated with inactivated antigen. Nevertheless, they should be considered potentially infectious and handled with care. No present method can offer complete assurance that infectious agents are absent. All material should be handled and disposed as potentially infectious. Observe the local regulations for clinical waste disposal.
8. Do not use this product in automated processors unless they have been previously validated for that purpose.

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING:**

Blood should be collected aseptically using venipuncture techniques by qualified personnel. Use of sterile or aseptic techniques will preserve the integrity of the specimen. Serum/plasma samples are to be refrigerated (2-8°C) upon collection or frozen (-20°C) if the test cannot be performed within 7 days. Samples should not be repeatedly frozen and thawed. Do not use hyperlipemic, hemolysed or contaminated samples. Samples containing particles should be clarified by centrifugation. The kit is suitable for use with serum or plasma.

**PRELIMINARY PREPARATION OF THE REAGENTS:**

All reagents supplied are ready to use. Only the VIRCLIA® WASHING SOLUTION included in the auxiliary component kit VIRCLIA® AUXILIARY REAGENTS must be prepared in advance. Fill 50 ml of VIRCLIA® WASHING SOLUTION (20x) up to 1 litre with distilled water. Should salt crystals form in the washing concentrate during storage, warm the solution to 37°C before diluting. Once diluted, store at 2-8°C.

**ASSAY PROCEDURE:**

**• AUTOMATED**

1. Bring VIRCLIA® WASHING SOLUTION (diluted according to the instructions) to room temperature before use (approximately 1 hour).

2. Follow the Operator's Manual of the Automated Processor.

**• MANUAL**

Contact the manufacturer for further information on the manual procedure.

**INTERNAL QUALITY CONTROL:**

Each batch is subjected to internal quality control (Q.C.) testing before batch release complying with specifications stricter than validation protocol for users. Final Q.C. results for each particular lot are available.

The control material is traceable to reference sera panels internally validated.

**VALIDATION PROTOCOL FOR USERS:**

Each monodose includes one calibrator (well A) and one dilution of the calibrator used as negative control (well C). It allows the validation of the assay and kit.

RLU of the calibrator and the negative control must fall in the following ranges. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

Control	RLU
CALIBRATOR	2-7
NEGATIVE CONTROL	<2

**INTERPRETATION OF RESULTS:**

Antibody index= (sample RLU/calibrator RLU)

Index	Interpretation
<0.9	Negative
0.9-1.1	Equivocal
>1.1	Positive

Samples with equivocal results must be retested and/or a new sample obtained for confirmation.

Samples with indexes below 0.9 are considered as not having antibodies of the specificity and class measured by this kit.

Samples with indexes above 1.1 are considered as having antibodies of the specificity and class measured by this kit.

**LIMITATIONS:**

1. This kit is intended to be used with human serum/plasma.
2. The user of this kit is advised to carefully read and understand the package insert. Strict adherence to the protocol is necessary to obtain reliable test results. In particular, correct sample and reagent pipetting, along with careful washing and timing of the incubation steps are essential for accurate results.
3. The results of samples should be used in conjunction with clinical evaluation and other diagnostic procedures. A definitive diagnosis should be made by isolation techniques.
4. This test will not indicate the site of infection. It is not intended to replace isolation.
5. Lack of significant rise in antibody level does not exclude the possibility of infection.
6. Samples collected very early in the course of an infection may not have detectable levels of IgG. In such cases, it is recommended an IgM assay be performed or a second serum sample be obtained 14 to 21 days later to be tested in parallel with the original sample to determine seroconversion.

7. Results in IgG detection in neonates must be interpreted with caution, since maternal IgG is transferred passively from the mother to the foetus before birth. IgM assays are generally more useful indicators of infection in children below 6 months of age.

8. The results of a single-specimen antibody determination should not be used to aid in the diagnosis of recent infection. Paired samples (acute and convalescent) should be collected and tested concurrently to look for seroconversion or a significant rise in antibody level.

9. The performance results showed correspond to comparative studies with commercial predicative devices in a defined population sample. Small differences can be found with different populations or different predicative devices.

**PERFORMANCES:**

**• SENSITIVITY AND SPECIFICITY:**

141 serum/plasma samples were assayed against a commercial ELISA kit. The results were as follows:

	Samples No.	Sensitivity (%)	Specificity (%)
IgM	141	90	94
95% C.I.		81-95	85-98

C.I. Confidence intervals

Indeterminate values were omitted from the final calculations.

**• INTRA-ASSAY PRECISION:**

3 sera were individually run 10 times each serum in a single automated assay in essentially unchanged conditions. The results were as follows:

Serum	N	% C.V.
Sample +	10	7
CAL	10	9
CN	10	13

C.V. Coefficient of variation

**• INTER-ASSAY PRECISION:**

3 sera were individually run on 5 consecutive days in 2 different automatic processors. The results were as follows:

Serum	N	% C.V.
Sample +	10	17
CAL	10	18
CN	10	30

C.V. Coefficient of variation

**Clinical evaluation:**

86 clinical sera samples were analyzed and the results were as follows:

Stage	Clinical presentation	Number of patients	IgM Positive VirClia
STAGE I	Lyme after tick bite	37	23
STAGE II	Neurologic lyme disease	29	4
STAGE III	Disseminated lyme disease	20	12

**Seroprevalence:** 90 blood donors (aged 18 to 65 years) from Spain were analysed. 2 positive results were obtained giving a seroprevalence of 2%.

**• CROSS REACTIVITY AND INTERFERENCES:**









22 samples known to be positive for other microorganisms (Leptospira, syphilis and Epstein-Barr virus VCA) were assayed. 23 samples known to be positive for rheumatoid factor and antinuclear antibodies were assayed.

The results of the test demonstrate the specific reaction of the IgM assay with no cross-reactivity to Leptospira (4 samples tested) and syphilis (8 samples tested). Cross reactivity with Epstein-Barr virus VCA (2 out of 10 tested samples) was found.

The results of the test demonstrate the specific reaction of the assay with no cross-reactivity to rheumatoid factor (13 samples tested). The results of the test demonstrate the specific reaction of the assay with no cross-reactivity to antinuclear antibodies (10 samples tested).

No interferences were observed in 3 samples tested with haemolytic (max 8.5 g / L), lipemic (max 2 g / L of triglycerides), hypercholesterolemic (max 4 g / L) or bilirubin-containing (max 3 g / L) sera or plasma.

**SYMBOLS USED IN LABELS:**

	In vitro diagnostic medical device
	Use by (expiration date)
	Store at x-y°C
	Contains sufficient for <n> test
	Batch code
	Catalogue number
	Consult instructions for use
	<X> wells

**BIBLIOGRAPHY:**

1. ECDC. Borreliosis: Factsheet for health professionals. Available from <http://ecdc.europa.eu/>. [1 July 2015].
2. CDC. Lyme disease. Available from <http://www.cdc.gov/>. [1 July 2015].
3. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 49(1):13-21.
4. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. 2005. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 18(3):484-509.
5. Stanek G, Strle F. 2009. Lyme borreliosis: a European perspective on diagnosis and clinical management. Curr Opin Infect Dis. 22(5):450-4.
6. Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, Norris SJ. 1999. Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol. 37(12):3997-4004.
7. Velan, B., M. Halmann. 1978. Chemiluminescence immunoassay. A new sensitive method for determination of antigens. Immunochemistry. 15: 331-333.
8. Whitehead, T.P., L.J. Kricka, T.J. Carter, G.H. Thorpe. 1979. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. Clin Chem. 25:1531-46.
9. Zhao, L., L. Sun, X. Chu. 2009. Chemiluminescence immunoassay. TrAC-Trend Anal Chem. 28: 404-415.

For any questions please contact: customerservice@vircell.com

REVISED: 2018-09-27  
L-VCM010-EN-01

## recomLine Borrelia IgG recomLine Borrelia IgM

### IVD

#### Instructions for use (English)

### 1 Purpose

The *recomLine Borrelia IgG, IgM* is a qualitative in vitro test for detection of IgG or IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. bavariensis* (former *B. garinii* OspA type 4 = *B. garinii* 1) and *B. spielmanii* in human serum, plasma or CSF.

### 2 Intended use

The *recomLine Borrelia IgG, IgM* is used for confirmation of samples that are positive or borderline in the screening test. It can also be used for detection of the human IgG or IgM antibodies formed intrathecally in the CSF (CSF/serum pairs) (s. 8.1).

The *recomLine Borrelia IgG, IgM* facilitates safe identification of specific antibodies against selected antigens of human pathogenic *B. burgdorferi* s.l. species. Antibodies against certain antigens can give additional indications on the stage of the infection.

### 3 Test principle

Highly purified recombinant *Borrelia burgdorferi* s. l. antigens (OspA, OspC, p100, VlsE, p39, p58, p18 (= DbpA, decorin-binding protein A), p41 (flagellin)) are fixed on nitrocellulose membrane test strips.

1. The test strips are incubated with the diluted serum or plasma sample, and the specific antibodies bind to the pathogen antigens on the test strips
2. Unbound antibodies are then washed away.
3. In a second step, the strips are incubated with anti-human immunoglobulin antibodies (IgG and/or IgM), which are coupled to horseradish peroxidase.
4. Unbound conjugate antibodies are then washed away.
5. Specifically bound antibodies are detected with a staining reaction catalysed by the peroxidase. If an antigen-antibody reaction has taken place, a dark band will appear on the strip at the corresponding point.

There are control bands at the upper end of the test strips:

- a) The reaction control with the strip number that must show a reaction for every serum / plasma sample.
- b) The conjugate controls (IgG, IgM) are used for the inspection of the antibody class detected. If, for example, the test strip is used for the detection of IgG antibodies, the IgG conjugate will show a distinct band.
- c) "Cutoff control": The intensity of this band allows the assessment of the reactivity of each of the antigen bands (see 9.2. Evaluation).

### 4 Reagents

#### 4.1 Package contents

The reagents in one package are sufficient for 20 (200) tests.

Each test kit contains:

<b>DILUBUF</b>	100 ml (500 ml) Dilution Buffer (ready-to-use) Contains Tris buffer, NaCl, detergent, MIT (0.01 %) and Oxyprylon (0.1%) preservatives, and protein
<b>WASHEUF A 10 X</b>	100 ml (500 ml) Wash Buffer A (10 times concentration) Contains phosphate buffer, NaCl, KCl, detergent, preservative: MIT (0.1%) and Oxyprylon (0.2%)
<b>SUBS TMB</b>	40 ml (2x 200 ml) Chromogenic substrate Tetramethylbenzidin (TMB, ready-to-use)
<b>MILKPOW</b>	5 g (5x 5 g) skim milk powder
<b>INSTRU</b>	1 Instructions for use
<b>EVALFORM</b>	1 (10) Evaluation form

Obtainable upon request:

<b>TEMPEVAL</b>	1 Evaluation template
-----------------	-----------------------

#### 4.1.1 *recomLine Borrelia IgG*

In addition to the components listed in 4.1, each test kit contains:

<b>TESTSTR</b>	2 (20) tubes, each with 10 numbered test strips
<b>CONJ IgG</b>	500 µl (4x 1,25ml) anti-human IgG conjugate (hundred times concentrated, green screw cap) From rabbit, contains NaN <sub>3</sub> (<0.1%), MIT (<0.1%) and chlorazetamide (<0.1%)

#### 4.1.2 *recomLine Borrelia IgM*

In addition to the components listed in 4.1, each test kit contains:

<b>TESTSTR</b>	2 (20) tubes, each with 10 numbered test strips
<b>CONJ IgM</b>	500 µl (4x 1,25ml) anti-human IgM conjugate (hundred times concentrated, purple screw cap) From rabbit, contains NaN <sub>3</sub> (<0.1%), MIT (<0.1%) and chlorazetamide (<0.1%)

### 4.2 Materials required but not supplied

- Incubation trays (can be purchased as needed from MIKROGEN)
- Deionised water (high quality)
- Plastic forceps
- Horizontal shaker
- Vortex mixer or other rotators
- Vacuum pump or similar device
- Volumetric cylinders, 50 ml and 1000 ml
- Micropipettes with disposable tips, 20 µl and 1000 µl
- 10 ml pipette or dispenser
- Timer
- Absorbent paper towels
- Disposable protective gloves
- Waste container for bio-hazardous materials

### 5 Shelf life and handling

- Store reagents at +2°C to +8°C before and after use, **do not freeze**.
- Subject all ingredients for at least 30 minutes to room temperature (+18°C to +25°C) before beginning the test. The test procedure is carried out at room temperature.
- Washing buffer, dilution buffer, conjugate and TMB can be interchanged between the different *recomLine* and *recomBlot* test systems, if these components carry the same symbols. Consider the shelf life of these components.
- Mix the concentrated reagents and samples thoroughly before use. Avoid a build up of foam.
- Only open the tube containing the test strip immediately before use to avoid condensation. Leave unused strips in the tube and continue to store at +2°C to +8°C (reseal tube tightly, test strips may not become moist before the test!).
- The strips are marked with the serial number, as well as the test code.
- The packages bear an expiration date. After this has been reached no guarantee of quality can be offered.
- Protect kit components from direct sunlight throughout the entire test procedure. The substrate solution (TMB) is especially sensitive to light.
- The test should only be carried out by trained and authorised personnel.
- In case of substantial changes to the product or the regulations for use by the user, the application may differ from the purpose given by MIKROGEN.
- Cross-contamination of patient samples or conjugates can lead to inaccurate test results. Add patient samples, test strips and conjugate solution carefully. Make sure that incubation solutions do not flow over into other wells. Carefully remove liquids.
- The strips must be completely wetted and submerged throughout the entire procedure.
- Automation is possible; you will receive further information from MIKROGEN.

### 6 Warnings and precautions

- For in vitro diagnostic use only
- All blood products must be treated as potentially infectious.
- The test strips were manufactured with inactivated whole cell lysates and/or recombinant produced bacterial, viral or parasitic antigens.
- After the addition of patient or control specimens the strip material must be considered infectious and treated as such.
- Suitable disposable gloves must be worn throughout the entire test procedure.

- ⚠ The reagents contain the antimicrobial agents and preservatives sodium azide, MIT (methylisothiazolone), oxyprion, chloroacetamide and hydrogen peroxide. Avoid contact with the skin or mucous membrane. Sodium azide can form an explosive azide upon contact with heavy metals such as copper and lead azide.
- ⚠ All siphoned liquids must be collected. All collecting containers must contain suitable disinfectants for inactivation of human pathogens. All reagents and materials contaminated with potentially infectious samples must be treated with disinfectants or disposed of according to your hygiene regulations. The concentrations and incubation periods of the manufacturer must be observed.
- ⚠ Use incubation trays only once.
- ⚠ Handle strips carefully using plastic forceps.
- ⚠ Do not substitute or mix the reagents with reagents from other manufacturers.
- ⚠ Read through the entire instructions for use before carrying out the test and carefully follow them. Deviation from the test protocol provided in the instructions for use can lead to erroneous results.

## 7 Sampling and preparation of reagents

### 7.1 Samples

The sample can be serum or plasma (EDTA, citrate, heparin, CPD), which must be separated as soon as possible from the blood clot after blood sampling to avoid a haemolysis. CSF can also be used. Avoid microbial contamination of the samples. Insoluble substances must be removed from the sample before incubation.

The use of heat-inactivated, icteric, haemolytic, lipemic or turbid samples is not recommended.

#### Caution!

If the tests are not carried out immediately, the samples can be stored for up to 2 weeks at +2°C to +8°C. Prolonged storage of the samples is possible at -20°C or below. Repeated freezing and thawing of samples is not recommended due to the risk of inaccurate results. Avoid more than 3 cycles of freezing and thawing.

### 7.2 Preparation of solutions

#### 7.2.1 Dilution buffer

The dilution buffer for serum dilution is ready-to-use.

#### 7.2.2 Preparation of ready-to-use wash buffer A

This buffer is required for conjugate dilution as well as washing stages. The volume of wash buffer A for the corresponding number of tests must be determined before dilution.

The skim milk powder is at first dissolved in wash buffer A concentrate and then filled with deionised water to the final volume (dilution 1+9). The quantities required for a defined number of test strips are to be calculated according to the following formula (device-specific dead volume is not considered):

Reagent	Formula	Example: 5 strips
Skim milk powder [g]	= number of strips x 0.1	0.5 g
Wash buffer A concentrate [ml]	= number of strips x 2	10 ml
Deionised water [ml]	= number of strips x 18	90 ml
Ready-to-use wash buffer A [ml]	= number of strips x 20	100 ml

Ready-to-use wash buffer A can be stored for four weeks at +2°C - +8°C. The ready-to-use wash buffer A is odourless and slightly turbid.

#### 7.2.3 Preparation of conjugate solutions

The conjugate solution must be prepared just before use. It is not possible to store the ready-to-use conjugate solution.

One part of the conjugate concentrate is diluted with 100 parts of ready-to-use wash buffer A (1 + 100).

The quantities required for a defined number of test strips are to be calculated according to the following formula:

Reagent	Formula	Example: 5 strips
Conjugate concentrate [µl]	= number of strips x 20	100 µl
Ready-to-use wash buffer A [ml]	= number of strips x 2	10 ml

The conjugate quantities are calculated without dead volume.

Depending on handling (manual or on a device), please mix additional conjugate for 1 to 3 strips.

## 8 Test procedure

No.	Execution	Note
1	Subject all reagents for at least 30 minutes to 18 - 25°C (room temperature) before beginning the test.	The test procedure is carried out at room temperature.
2	<u>Prepare test strips</u> Place strips in 2 ml ready-to-use dilution buffer.	Do not touch the strips with bare hands - use the forceps. The strip number points upward. A well is required in the incubation tray (see 4.2) for each strip. The strips must be completely immersed.
3	<u>Incubation of samples</u> a) 20 µl (IgG) and/or. 40 µl (IgM) of an undiluted sample (human serum or plasma) are pipetted onto the test strip for each incubation mixture. (Dilution 1 + 100 and/ or 1 + 50) b) Incubate for 1 hour with gentle shaking	Pipette the sample at one end of the immersed strip in the wash dilution buffer and mix as quickly as possible by carefully shaking the tray. Cover the incubation tray with plastic cover and place in the shaker.
4	<u>Washing</u> a) Carefully remove the plastic cover from the incubation trays. b) Gently siphon serum dilution from the individual wells. c) Pipette 2 ml ready for use wash buffer A in every well, wash for 5 minutes with gentle shaking and then siphon off the wash buffer A.	Carry out washing stages 8.4a - 8.4c <u>three times</u> altogether. Avoid cross-contamination  The manufacturer's instructions must be followed during automatic processing.
5	<u>Incubation with conjugate</u> Add 2 ml ready-to-use conjugate solution and incubate for 45 minutes with gentle shaking.	Cover the incubation tray with plastic cover and place in the shaker.
6	<u>Washing</u> see 8.4	Carry out washing stages <u>three times</u> altogether (see 8.4a - 8.4c)
7	<u>Substrate reaction</u> Add 1.5 ml ready-to-use substrate solution und incubate for 8 minutes with gentle shaking.	
8	<u>Stopping the reaction</u> Remove substrate solution Wash at least three times briefly with deionised water.	
9	<u>Drying the strips</u> Dry strip between 2 layers of absorbant paper for 2 hours before analysis.	Carefully remove strips from water using plastic forceps. Store strip away from light.
<b>Caution!</b> Incubation solutions must not flow into other wells. Splashing must be avoided especially when opening and closing the lid.		

### 8.1 CSF/serum analytics

For detection of human IgG and IgM antibodies formed intrathecally in the CSF (CSF/serum pairs), a separate instruction manual, patient data sheet and software is available. The current versions can be requested from Mikrogen (+49 89 54801-0) or are available as download ([www.mikrogen.de](http://www.mikrogen.de) → Downloads).

## 9 Results

### Caution:

Please do not use automated interpretation without consideration of the information on interpretation given below.

### 9.1 Validation – quality control

An analysis of the test can be carried out if the following criteria have been fulfilled:

1. Reaction control band (uppermost line) is clearly stained, dark band
2. Antibody class (second and third bands): the IgG or IgM conjugate control band must show a distinct staining.
3. Cut-off control (fourth band): weak, but visible staining

### 9.2 Evaluation

The analysis of the test strips can be visually or computer-assisted - using the test strip analysis software *recomScan*. The *recomScan* software is designed to support the evaluation of test strips. Further information and related instructions for the computer-assisted analysis is available on request from MIKROGEN. The following instructions relate to visual analysis.

#### 9.2.1 Assessment of band intensity

1. Note the date and batch number, as well as the detected antibody class, on the attached evaluation form.

- Enter the sample identification numbers in the evaluation sheet.
- Now stick the corresponding test strip onto the appropriate fields on the evaluation form using a glue stick. Align the test strip with the reaction control bands along the marked lines. Then use a transparent adhesive tape to attach the test strip to the left of the marked lines (do not tape over the reaction control band!). Sticking the entire test strip down flat using glue or tape can lead to changes in colour.
- Now identify the bands of the developed test strip on the basis of the printed control strip of the evaluation sheet and enter this in the evaluation sheet. For this purpose, carry out the assessment of the intensity of the occurring bands on the basis of table 1 separately for the corresponding immunoglobulin classes.

Table 1: Assessment of band intensity in relation to the cut-off band

Stain intensity of the bands	Assessment
No reaction	-
Very low intensity (lower than weakly cutoff band)	+/-
Low intensity (equivalent to cutoff band)	+
Strong intensity (stronger than cutoff band)	++
Very strong intensity	+++

### 9.3 Interpretation of test results

The test result is determined by adding the point values in accordance with Table 2 the individual bands reactive  $\geq$  cut-off (i.e. with a minimum grade of +). The resulting sum is entered in the column with the sigma (summation) symbol.

The positive, borderline or negative assessment of the sample can then be directly determined using Table 3 and entered in the assessment column of the evaluation sheet.

What is to be noted is that the point values are calculated only once for the reaction of the OspC and p18 bands, irrespective of which and how many OspCs and/or p18.

Table 2: Point assessment of the antigens

Antigen	Points IgG	Points IgM
p100	5	5
VlsE	6	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	5	4
OspA	5	5
OspC	5	8
p18	5	5

Table 3: Test interpretation

Sum of points	Assessment IgG	Sum of points	Assessment IgM
$\leq 5$	negative	$\leq 5$	negative
6-7	borderline	6	borderline
$\geq 8$	positive	$\geq 7$	positive

### 10 Limitations of the method - restrictions

- Serological test results must always be seen in the context of the clinical picture of the patient. Therapeutic consequences of the serological findings must always be taken in context with the clinical data.
- A negative test result for recomLine Borrelia cannot exclude an infection with Borrelia burgdorferi. In particular, in the early phase of the infection, antibodies may not be present or not present in a detectable quantity. In the early stage, an antibiotic treatment may prevent the development of detectable antibodies. Renewed sampling and testing should be done after three weeks when there is clinical suspicion of Lyme disease (Lyme Borreliosis) and negative or borderline serum finding.
- A positive result in recomLine Borrelia IgG and/or IgM does not always refer to the presence of active Lyme disease (Lyme Borreliosis). Since IgG antibodies and some IgM antibodies persist longer, the presence of antibodies of a previous infection can be the cause.
- The detection of antibodies formed intrathecally should be done upon clinical suspicion of neuroborreliosis. For this purpose, it is necessary to test CSF/serum pairs simultaneously in a quantifiable test (e.g. recomWell Borrelia). Corresponding to the usual 2-step serum diagnostics, borderline or positive results can be subsequently clarified with the recomLine Borrelia. Instructions for these tests can be requested from MIKROGEN (diagnostics of the Borrelia burgdorferi CSF). An Excel program can be requested from Mikrogen for facilitating the calculations for the CSF diagnostics (according to Reiber) (s. 8.1).

- A reaction with OspC is very characteristic for an early immune response (IgM). A strong reaction with the following bands mostly occurs in sera from late stages of the infection (IgG): p100, VlsE, p58, p39 and p18. On the contrary, antibodies against OspA are rarely found. The VlsE is a very early marker of the IgG response, but also frequently accompanies the immune response in late manifestation of the infection, and occurs besides p100 and/or p18.
- Through the selective use of the recombinant Borrelia burgdorferi antigens, a cross reaction with antibodies that are induced by infection with pathogens of the syphilis (Treponema pallidum), the recurrent fever (Borrelia recurrentis, Borrelia duttonii, Borrelia hermslii) or the leptospirosis (Leptospira sp.) are largely excluded. In an active Lues infection or a Lues serum scar, isolated antibody activities against the antigen p41 were found. A Lues infection should be excluded for unclear Borrelia serology.
- A polyclonal stimulation of B lymphocytes may occur in the presence of an infectious mononucleosis (Pfeiffer's gland fever, EBV infection). This can lead to unspecific reactions during the detection of antibodies of the IgM class. If the medical history is unclear and in the presence of a weak IgM response, it is recommended to exclude an EBV infection by differential diagnosis.
- Dark test strips: Some patient samples can produce a dark, uniform or patterned staining across the entire nitrocellulose strip. Various factors in each patient serum are responsible for this. The evaluation of these strips is usually only partly feasible. Thus, "inverse" bands (white bands on dark background), for example, should be evaluated as negative. The respective serum should always be examined using other serological methods.

### 11 Test performance

#### 11.1 Antigens and evaluation sera

recomWell Borrelia and recomLine Borrelia have been evaluated with serum and CFS samples mostly originating from southern and western parts of Germany. The sera derived from patients with typical clinical symptoms of different phases of Borrelia infection (Erythema migrans, Neuroborreliosis, Lyme arthritis and Acrodermatitis chronica atrophicans).

The following antigens are used for the production of the test systems:

- recomWell IgG: OspC (B. garinii and B. b. sensu stricto), p100 (B. afzelii), p18 (B. afzelii), VlsE (various strains).
- recomWell IgM: OspC (B. garinii and B. afzelii), p41 (B. bavariensis), VlsE (various strains).
- recomLine Borrelia IgG, IgM: p100 (B. afzelii), VlsE (various strains), p58 (B. garinii), p41 (B..b.sensu stricto), p39 (B. afzelii), OspA (B. afzelii), OspC (B..b.sensu stricto, B. afzelii, B. garinii, B. spielmanii), p18 (B. b..sensu stricto, B. afzelii, B. garinii, B. spielmanii, B. bavariensis).

#### 11.2 Diagnostic sensitivity

	Number	IgG positive/ borderline	IgM positive/ borderline	IgG/IgM positive/ borderline
Lyme arthritis	28	27 (96.4 %)	6 (21.4 %)	27 (96.4 %)
ACA*	11	11 (100 %)	1 (9.1 %)	11 (100 %)
Neuroborreliosis	35	32 (91.4 %)	18 (51.4 %)	34 (97.1 %)
Erythema migrans	42	18 (42.9 %)	30 (71.4 %)	33 (78.6 %)

\*Acrodermatitis chronica atrophicans

#### 11.3 Diagnostic specificity

recomLine Borrelia	Two comparison tests negative	
	IgG	IgM
Negative	170	169
Borderline	1	0
Positive	0	0
Specificity	99.4 %	100 %

#### 11.4 Detection rate

	Number	IgG positive/ borderline:	IgM positive/ borderline:	IgG/IgM positive/ borderline:
Blood donor serums*	200	24 (12 %)	5 (2,5 %)	28 (14 %)

\*from the southern German region



### 11.5 Analytical specificity

The analytical specificity is defined as the capacity of the test to determine the analytes exactly in the presence of potential interference factors in the sample matrix or cross reactions with potentially interfering antibodies.

**a) Interferences:** Control studies on potentially interfering factors have shown that the performance of the test is not influenced by anticoagulants (citrate, EDTA, heparin, CPD), haemolysis or lipaemia of the sample. False positive results occurred in icteric serums.

**b) Cross reactions:** In control studies, the potential interferences of antibodies against other organisms are examined. Sera of patients suffering from current infections with Treponema and CMV and ANA-positive sera may show cross reactivity in rare cases.

### 12 Literature

1. Fingerle V, Eiffert A, Gessner A, Göbel UB, Hofmann H, Hunfeld KP, Krause A, Pfister H-W, Reischl U, Sing A, Stanek G, Wilske B, Zöller L. Qualitätsstandard in der mikrobiologisch-infektologischen Diagnostik, Lyme Borreliose. MiQ 12 2017 2. Auflage
2. Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. Lyme neuroborreliosis - epidemiology, diagnosis and management. Nat Rev Neurol 2015, 11:446-456
3. Teward F, Diagnostik der Lyme-Borreliose. Mikrobiologe 24 Jg. 2014,13-21
4. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A et al. Lyme borreliosis: clinical case definition for diagnosis and mangement in Europe. Clin Microbiol Infect 2011, 17:69-79
5. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht, T, Schmutzhard and Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme Neuroborreliosis. European Journal of Neurology 2010, 17:8-16
6. Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new Borrelia species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Appl Environ Microbiol 2009 16, 5410-6
7. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007 49(1):13-21. Review
8. Richter D, Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G. Delineation of Borrelia burgdorferi sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of Borrelia spielmanii sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2006, 56(4): 873-81
9. Schulte-Spechtel U, Fingerle V, Goettner G, Rogge S, Wilske B. 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. 2006, 296 Suppl 40:250-66.
10. Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VisE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 2005 43(8): 3602-9
11. Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson B, Wilske B. Significant Improvement of the Recombinant Borrelia-Specific Immunoglobulin G Immunoblot Test by Addition of VisE and a DbpA Homologue Derived from Borrelia garinii for Diagnosis of Early Neuroborreliosis. J Clin Microbiol 2003, 41:1299 - 1303
12. Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrand B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rössler D, Schulte-Spechtel U. An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol 1999, 188(3):139-44
13. Roesler D, Eiffert H, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Preac-Mursic V, Teepe J, Schlott T, Soutschek E, Wilske B. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various Borrelia burgdorferi sensu lato strains. Med Microbiol Immunol 1995, 184(1):23-32
14. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease, a tick-borne spirochetosis? Science 1982, 216:1317-1319

We are glad to send you further reading on Lyme borreliosis diagnostics on request.

### 13 Explanation of symbols

	Content is sufficient for <n> applications Number of applications
<b>DILUBUF</b>	Dilution Buffer
<b>WASHBUF A 10 X</b>	Wash Buffer A (ten-fold concentration)
<b>SUBS TMB</b>	Tetramethylbenzidine chromogenic substance
<b>MILKPOW</b>	Skimmed milk powder
<b>INSTRU</b>	Instructions for use
<b>EVALFORM</b>	Evaluation form
<b>TEMPEVAL</b>	Evaluation template
<b>TESTSTR</b>	Test strips
<b>CONJ IgG</b>	Anti-human IgG conjugate
<b>CONJ IgM</b>	Anti-human IgM conjugate
	See instructions for use
<b>CONT</b>	Content, includes
<b>IVD</b>	In-vitro diagnostic device
<b>LOT</b>	Batch number
	Do not freeze
<b>REF</b>	Order number
	Use by Expiry date
	Store at x°C to y°C
	Manufacturer

### 14 Manufacturer and version information

recomLine Borrelia IgG		Article No. 4272 (4276)
recomLine Borrelia IgM		Article No. 4273 (4277)
Instructions for use valid from		GARLBB008EN 2019-01
	MIKROGEN GmbH Floriansbogen 2-4 82061 Neuried Germany Tel. Fax E-mail Internet	+49 89 54801-0 +49 89 54801-100 mikrogen@mikrogen.de www.mikrogen.de



GARLBB008

## Sikkerhetsdatablad

I samsvar med forordning (EC) nr. 1907/2006 (REACH)

Varebeskrivelse

**TMB/substratløsning for recomLine / recomBlot**  
**TMB**

Artikkelnummer: 10008/10038

### 1. Spesifikasjon av stoff/blanding og firma

Handelsnavn / beskrivelse:

TMB/substratløsning for recomLine / recomBlot

Identifisert bruk:

Laboratoriekjemikalier

Detaljer om leverandøren som leverer sikkerhetsdatabladet

- Selskapsnavn:  
Mikrogen GmbH  
Floriansbogen 2-4  
82061 Neuried, Tyskland
- Informerende enhet / telefonnr.:  
Tlf.: + 49(0)89 - 54801-118  
Faks.: + 49(0)89 - 54801-100  
E-post: [hendlmeier@mikrogen.de](mailto:hendlmeier@mikrogen.de)  
Ansvarlig for dette sikkerhetsdatabladet: Sonja Hendlmeier
- NØDNUMMER:  
Giftinformasjonen: (tlf. 22591300)

### 2. Mulige farer

- Klassifisering i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008 [CLP]: Ingen klassifisering i henhold til 1272/2008
- Identifikasjonselementer:

Farepiktogram	Signal ord
INGEN	INGEN

- Fareadvarsler:  
Produktet krever ikke en fareetikett i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008 (CLP).  
Ingen spesielle farer.

Vær imidlertid oppmerksom på informasjonen i dette sikkerhetsdatabladet

### 3. Sammensetning/detaljer av komponentene

- Beskrivelse: Vannaktig løsning.

- **Farlige ingredienser:**

CAS-nr.	EF-nr.	% [masse]	Navn	Klassifisering i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008 [CLP]
54827-17-7	259-364-6	< 0,05 %	3,3',5,5'-Tetrametylbenzidin	Kategori 3, H301; Kategori 3, H311; Kategori 1, H330; Kategori 2, H341
7722-84-1	231-765-0	< 0,013 %	Hydrogenperoksid	Kategori 4, H302; Kategori 1 H318
26172-55-4	247-500-7	< 0,0001 %	5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on	Kategori 2, H272; Kategori 1B H314; Kategori 1B H317; Kategori 1B, H334
2682-20-4	220-239-4	< 0,0001 %	2-metyl-4-isotiazolin-3-on	Kategori 2, H272; Kategori 1B H314; Kategori 1B H317; Kategori 1B, H334

- *3,3,5,5'-Tetrametylbenzidin krever ikke fareetikett i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008, konsentrasjon under 0,05 % (vekt:volum).*
- *Hydrogenhydroksid krever ikke fareetikett i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008, konsentrasjon under 0,013 % (vekt:volum).*
- *5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on krever ikke en fareetikett i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008, konsentrasjon under 0,0001 % (vekt:volum).*
- *2-Metyl-4-isothiazolin-3-on krever ikke en fareetikett i henhold til forordning (EC) nr. 1272/2008, konsentrasjon under 0,0001 % (vekt:volum).*

### 4. Førstehjelpstiltak

- **Generell informasjon:**  
Fjern umiddelbart klær som er forurenset med produktet.
- **Etter innånding:**  
Gå ut i frisk luft; ring lege hvis du blir kortpustet.
- **Etter hudkontakt:**  
Skyll med mye vann. Kontakt lege hvis hudirritasjonen vedvarer.
- **Etter øyekontakt:**  
Skyll åpne øyne med mye vann. Rådfør deg med en øyelege.
- **Etter svelging:**  
Skyll munnen og drikk vann. Rådfør deg med lege.

### 5. Brannsløkkingsprosedyrer

- **Egnet brannslukningsmiddel:**  
Produktet i seg selv brenner ikke, tilpass brannsløkkingsstiltak til nærliggende brann.
- **Spesielle farer på grunn av stoff eller blanding:**  
Ved brann kan giftige gasser, inkludert nitrogenoksider, frigjøres.

### 6. Tiltak ved utilsiktet utslipp

- **Personlige forholdsregler:**  
Ikke inhaler røyk.  
Bruk åndedrettsmaske, vernebriller, kalosjer, gummihansker.
- **Miljømessige forholdsregler:**  
Må ikke tømmes i avløp/overvann/grunnvann.

- **Metoder og materialer for inneslutning og opprydding**  
**Rengjøringsiltak:**  
Mekanisk plukke opp.  
Sørg for at rommet er godt ventilert og deretter rent.

## 7. Håndtering og oppbevaring

- **Håndtering Sikker**  
håndtering:  
Ingen spesielle tiltak er nødvendig hvis den håndteres og oppbevares på riktig måte.
- **Beskyttelse mot brann og eksplosjon:**  
Ingen spesielle tiltak nødvendig.
- **Oppbevaring**  
**Krav til lagerrom og containere:**  
Lukk åpnede beholdere nøye og oppbevar dem oppreist for å unngå lekkasje.
- **Kombinert oppbevaring:**  
Ingen kjøte.
- **Ytterligere informasjon om lagringsbetingelser:**  
Ingen spesielle tiltak nødvendig.
- **Anbefalt lagringstemperatur: Verdi**  
**+2°C - +8 °C**

## 8. Eksponeringsbegrensning og kontroller/personlig beskyttelse -

Parametre som skal overvåkes:

CAS-nr.	EF-nr.	Navn	AGW i henhold til TRGS 900
54827-17-7	259-364-6	3,3,5,5-Tetrametylbenzidin	Ikke listet
7722-84-1	231-765-0	Hydrogenperoksid	1,4 mg/m <sup>3</sup>
26172-55-4	247-500-7	5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on	0,05 mg/m <sup>3</sup>
2682-20-4	220-239-4	2-metyl-4-isotiazolin-3-on	Ikke listet

- **Forebyggende medisinske undersøkelser for arbeidsplassen bør gjøres tilgjengelig.**
- **Eksponeringsgrenseverdier:**  
Ingen data tilgjengelig.
- **Personlig verneklær: Bruk**  
**personlige verneklær.**
- **Åndedrettsvern: Ingen**  
**spesielle tiltak nødvendig.**
- **Hansker:**  
Vernehansker (DIN EN 455); Vernehanskene bør i alle tilfeller kontrolleres for deres arbeidsplassspesifikke egnethet (f.eks. mekanisk motstand, produktkompatibilitet, antistatiske egenskaper). Følg instruksjonene og informasjonen fra produsenten av vernehansker angående bruk, oppbevaring, vedlikehold og utskifting av hansker. Hvis skadet eller viser første slitasjemerker, bør vernehanskene skiftes umiddelbart. Tilrettelegg arbeidsprosessene på en slik måte at hanskene ikke trenger å brukes kontinuerlig.

Egnet materiale	Nitril	Egnet materiale	Lateks
Materialtykkelse	0,4 mm	Materialtykkelse	0,4 mm
Penetrasjonstid	> 120 min.	Penetrasjonstid	> 120 min.

- Øyebeskyttelse:  
Vernebriller (DIN EN 166)
- Kroppsbeskyttelse:  
Standard laboratoriearbeidsklær
- Generelle verne- og hygienetiltak:
  - Ikke røyk, spis eller drikk under arbeid.
  - Holdes unna mat og drikke.
  - Vask hendene før pauser og etter jobb.
  - Unngå kontakt med øyne og hud.
  - Fjern umiddelbart skitne eller gjennomvåte klær.

## 9. Fysiske og kjemiske egenskaper

### Generell informasjon:

- **Utseende:**
  - Skjema:
  - Farge: Væske
- **Lukt:** Fargeløs til svakt blå
- **Luktterskel:** Karakteristikk
- **PH verdi:** Ikke bestemt
- **Tilstandsendringer**
  - Smeltepunkt / smelteområde: 4,9-5,1
  - Kokepunkt / kokeområde: Ikke bestemt
  - Flammepunkt: 101°C
  - Brennbarhet (fast, gassformig): Passer ikke
  - Antennelsestemperatur: Passer ikke
  - Dekomponeringstemperatur: Ikke bestemt
  - Selvantennelse: Produktet selvantenner ikke.
  - Fare for eksplosjon: Produktet er ikke en eksplosjonsfare.
- **Eksplosjonsgrenser:**
  - Nedre: Ikke bestemt
  - Øverste: Ikke bestemt
- **Damptrykk ved 20°C:** Ikke bestemt
- **Tetthet:** 1,013 g/ml
- **Relativ tetthet:** Ikke bestemt
- **Damptetthet:** Ikke bestemt
- **Fordampningsrate:** Ikke bestemt
- **Løselighet i / blandbarhet med vann:** Fullstendig blandbar
- **Fordelingskoeffisient (n-oktanol/vann):** Ikke bestemt

## 10. Stabilitet og reaktivitet

- Forhold som skal unngås:  
Ingen hvis brukt riktig.
- Stoffer som skal unngås:  
Ingen kjente.

- Farlige nedbrytningsprodukter: Ingen farlige nedbrytningsprodukter kjent.

## 11.Toksikologisk informasjon

Informasjon om toksikologiske effekter

Komponenter	Type	Verdi	Arter
3,3',5,5'-tetrametylbenzidin	Ingen data tilgjengelig		
Hydrogenperoksid	LD <sub>50</sub> (muntlig)	1232 mg/kg	Rotte
	LD <sub>50</sub> (dermal)	3000 mg/kg	Kanin
5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on	LD <sub>50</sub> (muntlig)	3350 mg/kg	Rotte
2-metyl-4-isotiazolin-3-on	LD <sub>50</sub> (muntlig)	550 mg/kg	Rotte

Irritasjon

- Irritasjon på huden evaluering  
Lett irriterende
- Irritasjon for øyet evaluering  
Lett irriterende
- Sensibilisering evaluering  
Sensibilisering mulig
- Irritasjon av luftveiene evaluering  
Lett irriterende
- Praktisk erfaring  
Kan forårsake sensibilisering ved kontakt med huden.
- Annen informasjon  
Produktspesifikke toksikologiske data er ikke kjent.

## 12.Miljøinformasjon

Denne informasjonen er kun relevant for konserveringsmidlene 5-klor-2-metyl-4-isotiazolin-3-on og 2-metyl-4-isotiazolin-3-on.

Arter	Type	Verdi
Ørret	LC <sub>50</sub> (mg/l)	0,19
Abbor	LC <sub>50</sub> (mg/l)	0,28
Tang ( <i>Skeletonema costatum</i> )	EC <sub>50</sub> (mg/l)	0,003
Alger ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	EC <sub>50</sub> (mg/l)	0,018
Virvelløse dyr ( <i>Daphnia magna</i> )	EC <sub>50</sub> (mg/l)	0,16

## 13. Avhendingshensyn

- Produkt: Tildeling av avfallskodenummer skal skje i henhold til European Waste Catalogue (AVV – Waste List Ordinance) i samråd med regional avfallshåndtering.
- Emballasje: Avhending i henhold til offentlige forskrifter.

## 14. Transportinformasjon

Ikke underlagt transportforskrifter i henhold til ADR, RID, IATA og IMDG.

## 15. Forskriftsmessig informasjon

- Forskrifter om sikkerhet, helse og miljøvern / spesifikke lovbestemmelser for materialet eller blandingen
- Nasjonale forskrifter:
- Informasjon om bruksbegrensning:  
Legg merke til begrensningene for bruk for unge personer i henhold til § 22 JArbSchG.
- Forordningen om farlige hendelser:
- Klassifisering i henhold til VbF: Ikke aktuelt
- Vannfareklasse: Ikke farlig for vann
- Kjemikaliesikkerhetsvurdering: Det er ikke utført noen kjemikaliesikkerhetsvurdering.

## 16. Annen informasjon

### Mer informasjon

- Informasjonen er basert på vår nåværende kunnskap. Den er ment å beskrive produktene våre når det gjelder sikkerhetskrav, men representerer ingen forpliktelse når det gjelder produktkvalitet, og utgjør heller ingen kontraktmessig juridisk forpliktelse.
- Seksjon som utsteder databladet: Arbeidsvern- og miljøvernavdelingen
- Forkortelser og akronymer:
  - RID: Règlement international concernant le transport des marchandises dangereuses par chemin de fer (forskrifter vedrørende internasjonal transport av farlig gods med jernbane)
  - ICAO: International Civil Aviation Organization
  - ADR: Accord européen sur le transport des marchandises dangereuses par Route (europeisk avtale om den internasjonale
  - Transport av farlig gods på vei)
  - IMDG: International Maritime Code for Dangerous Goods
  - IATA: International Air Transport Association
  - GHS: Globalt harmonisert system for klassifisering og merking av kjemikalier
  - EINECS: Europeisk oversikt over eksisterende kommersielle kjemiske stoffer
  - CAS: Chemical Abstracts Service (avdeling av American Chemical Society)
  - VbF: Verordnung über brennbare Flüssigkeiten, Österreich (Forordning om lagring av brennbare væsker, Østerrike)
  - LC50: Dødelig konsentrasjon, 50 prosent
  - LD50: Dødelig dose, 50 prosent
  - LD50\*: Dødelig dose, 50 prosent (ikke relevant for klassifisering)
  - LC50\*: Dødelig konsentrasjon, 50 prosent (ikke relevant for klassifisering)
  - H272, kategori 2, kan forverre brann; oksidasjonsmiddel.
  - H301, kategori 3, giftig ved svelging.
  - H302, kategori 4, farlig ved svelging.
  - H311, kategori 3, giftig ved hudkontakt
  - H314, kategori 1B, forårsaker alvorlig forbrenning av hud og øyeskader.
  - H317, kategori 1B, kan forårsake allergiske hudreaksjoner.
  - H318, kategori 1, forårsaker alvorlig øyeskade.
  - H330, kategori 1, kan være dødelig ved innånding.
  - H334, kategori 1B, kan forårsake allergi, astmatiske symptomer eller pustevansker ved innånding.
  - H341, kategori 2, kan forårsake genetiske defekter.

# Auswertebogen Evaluation Form

# MIKROGI

D I A G N O S T



Datum 22/08/23 Bearbeiter  
 Date 22/08/23 Testing person  
 Chargen-Nr.                      Röhren-Nr.  
 Lot No.                      Tube No.

Antikörperklasse                      Farbezeit  
 Antibody class                      Time of staining

Wichtig für die korrekte Befundfindung und Auswertung mit recomScan ist die absolute Übereinstimmung Ihres Auswertebogens mit dem mikrobiellsten Original-Auswertebogen. Bitte beachten Sie dies, falls Sie selbst Kopien oder Ausdrücke anfertigen. If you copy or print out the evaluation form by yourself, please check your copies on absolute compliance with the enclosed original evaluation form. This is important to get the correct interpretation and evaluation using recomScan.

Nr. No.	Probe Sample	IgG	IgM	recomLine Borrelia IgG		recomLine Borrelia IgM		Nr. No.	Antigenbanden Antigen bands											Beurteil Interpret							
				Art.-Nr., Art. No. 4272 / 4273 / 4276 / 4277	Art.-Nr., Art. No. 4272 / 4273 / 4276 / 4277	p100	VisE		p58	p41	p39	OspA	OspC			p18			Negativ negative		Fraglich borderline						
				Reaktions-Ktr.	AK-Klassen-Kontrolle		Cutoff-Kontrolle					B. s.s.	B. afz.	B. gar.	B. spiel.	B. s.s.	B. afz.	B. bav.*	B. gar.	B. spiel.							
1		✓	✓																						5 5	6	
2		✓	✓																								
3		✓	✓																								
4		✓	✓																								
5		✓	✓																								
6		✓	✓																								
7		✓	✓																								
8		✓	✓																								
9		✓	✓																								
10		✓	✓																								
11		✓	✓																								
12		✓	✓																								
13		✓	✓																								
14		✓	✓																								
15		✓	✓																								
16		✓	✓																								
17		✓	✓																								
18		✓	✓																								
19		✓	✓																								
20		✓	✓																								



Vedlegg 9

Info No	Type	Ig	PID	Sample No.	Strip	Antigens	Rev.Antigens	Results
1	Patient	IgM			ReaktKontr(0) IgG(1) IgM(2) CutOff(3) p100(4) Vlse(5) p58(6) p41(7) p39(8) OspA(9) OSpCBss(10) OSpCBaf(11) OSpCBga(12) OSpCBsp(13) p18Bss(14) p18Baf(15) p18Bba(16) p18Bg(17) p18Bsp(18)	*p100: *Vlse: *p58: p41: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp: p18Baf		positive, 19point(s)
2	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 10 11 12 13 15	p41: *OspA: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 9point(s)
3	Patient	IgM			0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18	p100: *Vlse: p41: *p39: *OspCBss: *OspCBga: *OspCBsp: *p18Bss: *p18Baf: *p18Bba: *p18Bg: *p18Bsp		borderline, 6point(s)
4	Patient	IgM			0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16	*p39: *OspA: *OspCBaf: *OspCBga: *OspCBsp: *p18Bss: *p18Bba		negative, 0point(s)
5	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	*p41: *OspCBga: *OspCBsp		negative, 0point(s)
6	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	p100: Vlse: p41: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 19point(s)
7	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 15	*p100: Vlse: *OspCBaf: *OspCBga: *OspCBsp: p18Baf		positive, 10point(s)
8	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	*p41: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 8point(s)
9	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 15	*p100: Vlse: *p58: *OspCBaf: *OspCBga: p18Baf		positive, 10point(s)
10	Patient	IgM			0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 15	*p58: *p39: *OspCBaf: *OspCBga: *OspCBsp: p18Baf		negative, 0point(s)
11	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	*Vlse: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 8point(s)
12	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	p41: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 9point(s)
13	Patient	IgM			0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13	*p41: OSpCBss: OSpCBaf: OSpCBga: OSpCBsp		positive, 8point(s)

**Borreliaserologi - tolkning av resultater**

Forfatter: Jan Egil Afset  
Godkjent av: RPA Systembruker

Gyldig fra: 23.10.2020  
Revisjonsfrist: 23.10.2022

Revisjon: 2.3  
ID: 32956

**Hensikt**

For best mulig tolkning og besvarelse av borreliaserologi må en sammenholde klinisk informasjon fra rekvirent, epidemiologiske kunnskap og resultat av laboratorieanalyser. Formålet med denne prosedyren er å sikre at analysene blir tolket og besvart av laboratoriets leger så likt som mulig og i overensstemmelse med gjeldende nasjonale og internasjonale faglige retningslinjer.

Anbefalingene som gis under er ment som forslag til besvarelser, men hvert enkelt tilfelle må vurderes individuelt, og det vil da av og til kunne være behov for å benytte andre kommentarer.

**Omfang**

Proseduren gjelder leger ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi (AMM), og bioingeniører som legger inn svar og kommentarer i laboratoriets datasystem.

**Grunnlagsinformasjon**

Lyme borreliose er et sykdomskompleks med ulike manifestasjoner, spesielt hudforandringer, leddplager og nevrologiske manifestasjoner. Sykdommen er en zoonose og forårsakes av en vektoroverført spiroket, *Borrelia burgdorferi*. Betegnelsen *Borrelia burgdorferi sensu lato* brukes som en *samlebetegnelse* for >10 forskjellige arter av denne bakteriefamilien. I Europa er 5-6 borreliaarter assosiert med sykdom hos mennesket, de tre vanligste subtype er: *Borrelia afzelii* særlig assosiert hudmanifestasjoner, *Borrelia garinii* assosiert med nevroborreliose og *Borrelia burgdorferi sensu stricto* assosiert med både hud-, ledd- og CNS-sykdom. Borreliainfeksjon er den vanligste vektoroverførte sykdom i Europa. Vertsdyr er gnagere og fugler. Vektor i Norge er skogflått (*Ixodes ricinus*) og fugleflått (*Ixodes uriae*).

Sykdomsmanifestasjoner inndeles i tre kategorier;

-*tidlig lokal sykdom*: Lokalt karakteristisk utslett kalt erytema migrans (EM) opptrer 3- 30 dager etter bitt evt. med slapphet, feber, hodepine og muskelsmerter.

-*tidlig systemisk sykdom*: Opptrer to uker til flere måneder etter bitt. Flere organer kan være involvert med muskel- og leddsmerter, evt. utslett, kardiittsymptomer og/eller meningittsymptomer. Nakkestivhet er sjeldent. Ulike nevrer med sterke radikulære, vandrende smerter og pareser. Mest vanlig er facialispårese.

-*senmanifestasjoner*: Symptomer som har vedvart mer enn seks måneder. Hudforandringer kalt acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), artritt i store ledd og vedvarende neuroborreliose med ulike manifestasjoner som tretthet, depresjon, ataksi og pareser.

Akutt nevroborreliose: Antistoffrespons kan komme forsinket i forhold til debut av klinikk. Negativ spinalvæske- serum antistoffindeks (AI) etter 6-8 ukers symptomer på neuroborreliose er svært sjelden.

Artritt: Ikke påvist Borrelia antistoff taler for annen årsak.

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) og kronisk artritt: Ikke påvist Borrelia antistoff utelukker ACA og kronisk artritt.

Øye-afleksjon: Påvist borrelia antistoff i serum er nødvendig diagnostisk kriterium per 2009, men diagnostisk verdi likevel usikker. Antistoff produksjonen er ofte svært lav og detekteres i noen tilfeller kun med en sensitiv undersøkelse.

Antistoffundersøkelse er vanligvis ikke egnet ved følgende problemstillinger:

- Flåttbitt uten EM. Begrunnelse: 95 % av personer som er bitt av flått som inneholder *Borrelia* vil ikke få noen symptomer. Påvist antistoff vil representere tidligere møte med mikroben. Evt kommentar: **FUSB** (se tabell)

- Pasienten vil vite sin borrelia status. Begrunnelse: Påvist antistoff vil representere tidligere møte med mikroben og antistoff beskytter ikke mot ny infeksjon.

- Hos pasienter med uspesifikke symptomer. Diffuse symptomer som med overveiende sannsynlighet ikke representerer Lyme borreliose.

- Kontroll av behandlet LB. Begrunnelse: Med de metoder som benyttes i dag, kan borreliaantistoffer påvises i mange år etter infeksjon både i serum og spinalvæske, også etter adekvat terapi.

Ved AMM benyttes kjemiluminiscenstesten LIAISON®Borrelia IgM Quant og LIAISON®Borrelia IgG sammen med analyseinstrumentet LIAISON®XL fra Diasorin. Testen benytter rekombinante antigener for overflateproteinene VlsE og OspC (IgM) og VlsE (IgG). I tillegg kan Elisatesten recomWell IgM fra Mikrogen benyttes .

**Bakgrunnsinformasjon for besvaring****Serumprøver**

Resultatene for positive prøver og prøver med grenseverdi vil bli besvart i AU/mL.

Cut off IgM: 20 AU/mL er beregnet fra gråsoner oppgitt fra produsent (øvre grense 22 AU/mL + nedre grense 18 AU/mL)/2).

Cut off IgG: 12,5 AU/mL er beregnet fra gråsoner oppgitt fra produsent (øvre grense 15 AU/mL + nedre grense 10 AU/mL)/2).

Vi beregner gråsoner basert på reproduserbarhet (% CV) i våre oppsett.

Gråsonen vurderes to ganger i året (8) i henhold til prosedyre "Driftskontroller og gråsoner, infeksjonsimmunologi".

Se prosedyre:

 36316 [Infeksjonsimmunologi, gjeldende gråsoner, AMM.](#)

Det er beregnet gråsoner for IgM og IgG.

Negativ defineres som < gråsonens nedre verdi.

Positiv defineres som > gråsonens øvre verdi.

I tillegg defineres et område for lavt positivt resultat fra øvre del av gråsoner til 2 x cut off.

		Negativ	Grenseverdi	Positiv
Serum	IgM	Se gjeldende gråsone	Se gjeldende gråsone	Se gjeldende gråsone
	IgG	Se gjeldende gråsone	Se gjeldende gråsone	Se gjeldende gråsone

IgM analysegrense: Serum: 2-190 AU/mL.  
IgG analysegrense: Serum: 5-240 AU/mL.

### Spinalvæske

Vi benytter gråsone oppgitt fra produsent.

Spinalvæske	IgM	<2,5	2,5-3,4	≥3,5
	IgG	<4,5	4,5-5,4	≥5,5

IgM analysegrense: Spinalvæske: 0-190 AU/mL.  
IgG analysegrense: Spinalvæske: 0,2-240 AU/L.

Ved spesielle problemstillinger kan line blot analyse (Mikrogen recomLine Borrelia IgM/ IgG) benyttes til verifikasjon av CLIA/Elisa-resultater, og/ eller prøven kan sendes til nasjonalt referanselaboratorium for borreliadiagnostikk ved Sørlandet sykehus, Kristiansand(SØRL).

## Arbeidsbeskrivelse

### Ansvar

Leger godkjenner analyseoppsett, tolker og besvarer prøveresultat. Alt personell (bioingeniør og lege) som skal arbeide med prøven.

### Fremgangsmåte besvaring

#### CLIA

Negativ test alene utelukker ikke borreliose. Resultatet må vurderes i relasjon til antatt smittetidspunkt, type og varighet av symptomer, ledsagende symptomer og objektive funn, som munner ut i en samlet vurdering av sannsynlighet for borreliose. Kontrollprøve er kun indisert hvis akutt klinikk og antibiotikabehandling avventes.

#### Besvaring av IgM komponent

IgM komponenten besvares som **Negativ** eller **Se merknad**. På grunn av usikkerhet skal ikke IgM besvares som positiv.

#### Besvaring av IgG komponent

IgG komponenten besvares som **Negativ**, **Gråsone**, **Positiv** eller **Se merknad** avhengig av vurdering av resultatet og kliniske opplysninger.

#### Kommentarer

Kommentarene legges inn på komponenter. Dersom isolert IgM vil det være hesiktsmessig å legge inn kommentarene under IgM komponenten, dersom det også er utslag på IgG, kan man legge kommentarene på IgG komponenten.

#### Negativt resultat i CLIA S-IgM og S-IgG:

Serumprøver som er negativ på IgM og IgG verifiseres ut av ansvarlig bioingeniør med kommentarene:

**.serBO6U** Antistoffer mot Borrelia burgdorferi kan komme sent. Dersom klinisk mistanke om borreliasykdom og prøven er tatt tidlig i forløpet, anbefales oppfølgingsprøve seks uker etter sykdomsdebut. Husk å merke oppfølgingsprøven med "Kontrollserum."

#### Positiv S-IgG med verdi ≥ 25 AU/ml (2x cut off) (+/- IgM):

Svaralternativ avhengig av kliniske opplysninger (se under):

**.serFATI** Forenlig med aktuell eller tidligere gjennomgått infeksjon

#### -Erythema migrans (EM):

Kun ca 50% seropositivitet ved tidlig borreliose. Positiv serologi kan persistere i måneder /år, og funn kan derfor representere tidligere infeksjon. Tidlig AB behandling kan medføre manglende IgG respons. Dersom viktig å avklare diagnose evt biopsi fra randsone av utslett til PCR (sensitivitet 40-90%, sendes referanselab i Kristiansand).

**.serBODI** Serologi er dårlig egnet til diagnostikk av Erythema migrans (EM) pga sen/ usikker immunrespons. Antibiotikabehandling anbefales gitt dersom klinisk mistanke.

#### -Borrelia lymfocytom:

Klinisk diagnose, mikrobiologisk undersøkelse vanligvis ikke nødvendig, vanligvis seropositiv når pasienten oppsøker lege, evt biopsi for å utelukke malignitet.

**.serBIOV** Biopsi bør vurderes

-Dersom kliniske opplysninger indikerer mulig nevroborreliose og spinalvæske-us ikke er rekvirert:

**.serNEV** Dersom mistanke om nevroborreliose anbefales spinalvæske til us på Borrelia antistoff.

#### Positiv IgG med verdi <25 (øvre gråsone til 2x cut off) AU/mL(+/- IgM):

**.serLIGT** Lavt IgG

**.serUSKL** Usikker klinisk betydning

**.serBO6U** Antistoffer mot Borrelia burgdorferi kan komme sent. Dersom klinisk mistanke om borreliasykdom og prøven er tatt tidlig i forløpet, anbefales oppfølgingsprøve seks uker etter sykdomsdebut. Husk å merke oppfølgingsprøven med "Kontrollserum."

#### Isolert positiv IgM (IgG negativ): (OBS! husk å besvare komponenten med «Se merknad»)

Ved kort sykehistorie (< 6 uker):

(dersom verdi <40 AU/ml (øvre gråsonen til 2 x cut off))

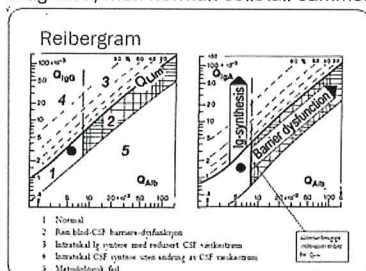
- .serLIGU Lavt IgM titer uten IgG respons
- .serIMUE Isolert IgM representerer vanligvis uspesifikk reaksjon i ELISA-test.
- .serBO6U Antistoffer mot Borrelia burgdorferi kan komme sent. Dersom klinisk mistanke om borreliasykdom og prøven er tatt tidlig i forløpet, anbefales oppfølgingsprøve seks uker etter sykdomsdebut. Husk å merke oppfølgingsprøven med "Kontrollserum."
- Evt .serNEV dersom mulig nevroborreliose.
- Tillegg hos barn (hyppigere kun IgM hos barn).
- .serAKIM Aktuell infeksjon mulig.

Ved sykehistorie >6 uker:

- .serLIGU (dersom verdi <40 AU/ml (øvre gråsonen til 2 x cutoff))
- .serNEPE Neppe klinisk betydning.
- .serIMUE Isolert IgM representerer vanligvis uspesifikk reaksjon i ELISA-test.
- .serIGG Tidlig behandlet infeksjon kan gi manglende IgG respons.
- Evt .serNEV dersom mulig nevroborreliose.
- .serLBOR Analysen er utført med LIAISON® Borrelia IgM Quant/ IgG.

Ved funn av IgM og IgG i spinalvæske:

- Antistoffindeks beregnes med Reibers metode.
- Sjekk at verdiene for IgM og IgG i spinalvæske og serum ligger innenfor analyseområdet for testen.
- IgM analysegrense: Serum: 2-190 AU/mL, spinalvæske: 0-190 AU/mL.
- IgG analysegrense: Serum: 5-240 AU/mL, spinalvæske: 0,2-240 AU/L.
- Prøver(serum og spinalvæske) som inneholder antistoffnivåer over analyseområdet for testen, blir fortyntet i henhold til brukerveiledningen fra Diasorin ved hjelp av instrumentets fortynningsfunksjon. Resultatet blir så automatisk multiplisert med fortynningsfaktoren i analyseinstrumentet for å få fram antistoffnivåene i de rene (ufortynnede) prøvene.
- Aktuelle prøver sendes ned til 2. etg for analyse av spinalvæske- og serum albumin, total IgG og total IgM.
- Når disse resultatene er ferdige, legges resultatene (AU/mL) av Borrelia-antistoffundersøkelse for både serum og spinalvæske inn i Excel-arket "Beregning av Borrelia AI-indeks med Reibergram (Lindemann)" (se I: mikro/Leger/Faglig og metoder), sammen med resultater for albumin, total IgM og IgG i serum og spinalvæske (obs! benevning mg/L eller g/L).
- NB! Fortyningfaktor skal IKKE legges inn i Excel-arket.
- Legg inn alder på pasienten
- En får da kalkulert spinalvæske/serum-kvotient (Q) for albumin, total- IgG og -IgM, samt antistoff-indeks (AI) for Borrelia IgG og/eller IgM.
- I tillegg får en en grafisk framstilling av forholdet mellom  $Q_{albumin}$  og  $Q_{IgG/IgM}$  i Reibergramet. Dette benyttes i algoritmen som beregner AI-indeks, men en kan også vurdere om pasientens Reibergram passer med nevroborreliose, se figur under. Ved nevroborreliose ses vanligvis intratekal immunglobulinproduksjon (forhøyet  $Q_{IgM}$  og/eller  $Q_{IgG}$  dvs  $Q_{IgG}$  og/eller  $Q_{IgM} > Q_{lim}$ ), samt blod-hjerne barriere dysfunksjon ( $Q_{alb}$  høyere enn forventet i forhold til alder). Sjekk også celletall i spinalvæsken: vanligvis forhøyet celletall ved akutt nevroborreliose. Kan ha normalt celletall i tidlig fase, men normalt celletall sammen med positiv AI indeks mest forenlig med tidligere gjennomgått nevroborreliose.



### Besvaring av spinalvæskefunn

Komponentene Sp-Borrelia IgM og Sp-Borrelia IgG besvares med **Negativ** eller **Se merknad**  
Sp-Borrelia antistoffindeks besvares med **Negativ**, **Gråsonen**, **Positiv** eller **Se merknad**

### Negativ både IgM og IgG:

.serBO6U Antistoffer mot Borrelia burgdorferi kan komme sent. Dersom klinisk mistanke om borreliasykdom og prøven er tatt tidlig i forløpet, anbefales oppfølgingsprøve seks uker etter sykdomsdebut. Husk å merke oppfølgingsprøven med "Kontrollserum."

### Positiv IgM og/ eller IgG:

Sp-Borrelia antistoffindeks < 1,3: **Negativ**

.serKISN Konklusjon: ikke serologisk holdepunkt for nevroborreliose.

Sp-Borrelia antistoffindeks  $\geq 1,3$  og < 1,5: **Gråsonen**

.serUSKL

Videre kommentar avhengig av kliniske opplysninger.

- Sp-Borrelia antistoffindeks  $\geq 1,5$ : **Positiv**

Vurder å ringe rekvirent

.serPIND Positiv spinalvæske/serum indeks for borrelia [IgM/IgG] med Reibers metode). Forenlig med intratekal produksjon av borreliaantistoffer. Dersom AI-indeks < 2:

.serLAI Lav AI-indeks. Resultatet bør tolkes med forsiktighet.

Ved høyt celletall i spinalvæske,  $Q_{IgM}/Q_{IgG} > Q_{lim}$  og patologisk  $Q_{alb}$ :

.serAKIS Aktuell infeksjon sannsynlig

.serNMSY Nominativt meldepliktig sykdom

**Meldepliktig flagg: Ja** (kopi av svar til MSIS)

Dersom normalt celletall i spinalvæske,  $Q_{IgM}/Q_{IgG} < Q_{lim}$  og/eller normal  $Q_{alb}$ :

.serUSKL Usikker klinisk betydning

.serFUFC Funn av positiv AI-index uten forhøyet celletall kan ses tidlig i forløpet av en nevroborreliose, men kan også ses i flere år etter gjennomgått meningo-radiculopati.

### Borrelia line blot analyse:

**-Negativt funn:** Negativ

**.serKONK** Konklusjon: Ikke serologisk holdepunkt for borreliainfeksjon.

Evt. **.serFKRM** Funn i IgM Elisa representerer sannsynlig kryssreagerende antistoffer, og/eller

**BORP** Analysen er utført med Borrelia Blot IgM/IgG, Mikrogen recomLine.

**-Positivt funn (IgM og/eller IgG):** Positiv

**.serBMWB** Borrelia line blot (Mikrogen recomLine) IgM positiv. Antistoffer mot: og/eller

**.serBGWB** Borrelia line blot (Mikrogen recomLine) IgG positiv. Antistoffer mot:

**.serKONB** Konklusjon: Påvist borrelia-spesifikke [IgM/IgG]-antistoffer med line blot analyse. (legg inn om det er IgM og/eller IgG).

Evt andre kommentarer i tillegg. For eksempel (dersom kun bånd mot ett antigen):

**.serLB1U** Bånd i line blot mot kun ett antigen anses vanligvis ikke som tilstrekkelig for å bekrefte tilstedeværelse av spesifikke borrelia-antistoffer.

**Aktuelle koder og kommentarer (starter med .ser)**

Kode	Kommentar
LAI	Lav AI-indeks. Resultatet bør tolkes med forsiktighet.
AKTIU	men aktuell infeksjon kan ikke utelukkes
BGWB	Borrelia line blot (Mikrogen recomLine) IgG positiv. Antistoffer mot :
BIOV	Biopsi bør vurderes.
BMWB	Borrelia line blot (Mikrogen recomLine) IgM positiv. Antistoffer mot :
BO6U	Antistoffer mot Borrelia burgdorferi kan komme sent. Dersom klinisk mistanke om borreliasykdom og prøven er tatt tidlig i forløpet, anbefales oppfølgingsprøve seks uker etter sykdomsdebut. Husk å merke oppfølgingsprøven med "Kontrollserum."
BODI	Serologi er dårlig egnet til diagnostikk av Erythema migrans (EM) pga sen/ usikker immunrespons. Antibiotikabehandling anbefales gitt på klinisk mistanke.
FATI	Førenlig med aktuell eller tidligere gjennomgått infeksjon
FKRM	Funn i IgM Elisa representerer sannsynlig kryssreagerende antistoffer.
FLÁT	Opplysninger om flåttbitt og evt. antibiotikabehandling ønskes.
FUFC	Funn av positiv AI-indeks uten forhøyet celletall kan ses tidlig i forløpet av en nevroborreliose, men kan også ses i flere år etter gjennomgått meningo-radiculopati.
FUSB	Flåttbitt uten symptomer på borreliainfeksjon anses vanligvis ikke som indikasjon for borreliaserologi.
IGG	Tidlig behandlet infeksjon kan gi manglende IgG respons ( <i>Aktuell kun i enkelte tilfelle</i> )
IMUE	Isolert IgM representerer vanligvis uspesifikk reaksjon i ELISA-test.
KISN	Konklusjon: ikke serologisk holdepunkt for nevroborreliose.
KONB	Konklusjon: Påvist borrelia-spesifikke [IgM/IgG]-antistoffer med line blot analyse (recomLine Borrelia).
KONK	Konklusjon: Ikke serologisk holdepunkt for borreliainfeksjon.
KRYM	Kryssreagerende antistoffer mulig
KRYS	Kryssreagerende antistoffer sannsynlig
LBIU	Bånd i Line Blot mot kun ett antigen anses vanligvis ikke som tilstrekkelig for å bekrefte tilstedeværelse av spesifikke borrelia-antistoffer.
MTINF	Mest førenlig med tidligere gjennomgått infeksjon,
NEV	Dersom mistanke om nevroborreliose anbefales spinalvæske til us på Borrelia antistoff.
OSPC	Reaktivitet i [OspC og/eller VlsE] tyder på tidlig immunrespons (IgM).
PIND	Positiv spinalvæske/serum indeks for borrelia [IgM/IgG] (indeks [tall] med Reibers metode). Førenlig med intratekal produksjon av borreliaantistoffer.
RPIN	Reaktivitet i [p100 og/eller p18] tyder på infeksjon i sent stadium
SEBK	Serologi dårlig egnet til kontroll av behandlingseffekt. Må vurderes ut fra klinisk bilde.
USRP	Sannsynlig uspesifikk reaksjon i primærttest.
LBOR	Analysen er utført med LIAISON® Borrelia IgM Quant/ IgG.
BORP	Analysen er utført med Borrelia Blot IgM/IgG, Mikrogen recomLine.
SORL	Prøven sendes til nasjonalt referanselaboratorium for borreliadiagnostikk ved Sørlandet sykehus, Kristiansand, for endelig konklusjon.

**Litteratur/Referanser**

- Staneek G. Lyme borreliosis: Clinical case definition... in Europé 2011;17:69.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=17%5Bvolume%5D+AND+69%5Bpage%5D+AND+2011%5Bpdat%5D+AND+staneek%5Bauthor%5D&cmd=detailssearch>
- Coumou J, van der Poll T, Speelman P, Hovius JW. Lyme borreliosis in the Netherlands. Tired of lyme borreliosis. Neth J Med. 2011 Mar;69(3):101-11  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=69%5Bvolume%5D+AND+101%5Bpage%5D+AND+2011%5Bpdat%5D+AND+coumou%5Bauthor%5D&cmd=detailssearch>
- Dessau et al Lyme Borreliose. Klinik, diagnostik og behandling. 2006.  
[http://www.ugeskriftet.dk/portal/page/portal/LAEGERDK/JUGESKRIFT\\_FOR\\_LAEGER/KLINISKE\\_VAERKTOEJER/KLARINGSRAPPORTER/L](http://www.ugeskriftet.dk/portal/page/portal/LAEGERDK/JUGESKRIFT_FOR_LAEGER/KLINISKE_VAERKTOEJER/KLARINGSRAPPORTER/L)
- Diagnostikk og behandling av Lyme Borreliose. Rapport til Helsedirektoratet fra arbeidsgruppen. 2009.  
<http://www.helsedirektoratet.no/publikasjoner/rapport-om-diagnostisering-og-behandling-av-flattsykdom/Publikasjoner/rapport-om-diagnostisering-og-behandling-av-flattsykdom.pdf>
- Laboratediagnostikk ved borreliose. Strategimøte 3. november 2011, Folkehelseinstituttet og referansegruppe for eksternt kvalitetssikring i virologi og serologi. <http://www.fhi.no/dokumenter/a63173de98.pdf>
- Koedel U, Fingerle V, Pfister HW. Lyme neuroborreliosis-epidemiology, diagnosis and management. Nat Rev Neurol. 2015 Aug;11(8):446-56. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2015.121>

