

**Entwicklung und Validierung  
multiplexer Assays zur Analyse der humoralen  
Immunantwort bei einer Borrelien-Infektion**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Julia Christina Häring  
aus München

Tübingen  
2022



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Prüfung:

27.04.2023

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Katja Schenke-Layland



**Betreuer an der Eberhard Karls Universität Tübingen**

Prof. Dr. Ulrich Rothbauer  
und  
Prof. Dr. Katja Schenke-Layland

**Betreuer am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut  
an der Universität Tübingen**

Dr. Nicole Schneiderhan-Marra  
und  
Dr. Alex Dulovic



## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, 14.11.2022

---

Julia Häring

## Publikationen

### Im Rahmen dieser Dissertation verfasste Publikationen

Julia Häring, Max J. Hassenstein, Matthias Becker, Julia Ortmann, Daniel Junker, André Karch, Klaus Berger, Tatia Tchitchagua, Olaf Leschnik, Manuela Harries, Daniela Gornyk, Pilar Hernández, Berit Lange, Stefanie Castell, Gérard Krause, Alex Dulovic, Monika Strengert, Nicole Schneiderhan-Marra. „*Borrelia multiplex*: A bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of *Borrelia* specific IgG/IgM class antibodies.” BMC Infectious Diseases 22, Article no: 859 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07863-9>

### Außerhalb dieser Dissertation verfasste Publikationen

Matthias Becker, Monika Strengert, Daniel Junker, Philipp D. Kaiser, Tobias Kerrinnes, Bjoern Traenkle, Heiko Dinter, Julia Häring, Stéphane Ghozzi, Anne Zeck, Frank Weise, Andreas Peter, Sebastian Hörber, Simon Fink, Felix Ruoff, Alex Dulovic, Tamam Bakchoul, Armin Baillot, Stefan Lohse, Markus Cornberg, Thomas Illig, Jens Gottlieb, Sigrun Smola, André Karch, Klaus Berger, Hans-Georg Rammensee, Katja Schenke-Layland, Annika Nelde, Melanie Märklin, Jonas S. Heitmann, Juliane S. Walz, Markus Templin, Thomas O. Joos, Ulrich Rothbauer, Gérard Krause & Nicole Schneiderhan-Marra. “Exploring beyond clinical routine SARS-CoV-2 serology using MultiCoV-Ab to evaluate endemic coronavirus cross-reactivity.” Nature Communications 12, Article no: 1152 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20973-3>

Teresa R Wagner, Elena Ostertag, Philipp D Kaiser, Marius Gramlich, Natalia Ruetalo, Daniel Junker, Julia Haering, Bjoern Traenkle, Matthias Becker, Alex Dulovic, Helen Schweizer, Stefan Nueske, Armin Scholz, Anne Zeck, Katja Schenke-Layland, Annika Nelde, Monika Strengert, Juliane S Walz, Georg Zocher, Thilo Stehle, Michael Schindler, Nicole Schneiderhan-Marra & Ulrich Rothbauer. “NeutrobodyPlex - monitoring SARS-CoV-2 neutralizing immune responses using nanobodies.” ENBO Reports 22 (2021). <https://doi.org/10.15252/embr.202052325>

Matthias Becker, Alex Dulovic, Daniel Junker, Natalia Ruetalo, Philipp D. Kaiser, Yudi T. Pinilla, Constanze Heinzl, Julia Haering, Bjoern Traenkle, Teresa R. Wagner, Mirjam Layer, Martin Mehrlaender, Valbona Mirakaj, Jana Held, Hannes Planatscher, Katja Schenke-Layland, Gérard Krause, Monika Strengert, Tamam Bakchoul, Karina Althaus Rolf Fendel, Andrea Kreidenweiss, Ulrich Rothbauer, Michael Schindler & Nicole Schneiderhan-Marra. “Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals.” Nature Communications 12, Article no: 3109 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23473-6>



---

Henning Jacobsen, Monika Strengert, Henrike Maaß, Mario Alberto Ynga Durand, Maeva Katzmarzyk, Barbora Kessel, Manuela Harries, Ulfert Rand, Leila Abassi, Yeonsu Kim, Tatjana Lüddecke, Kristin Metzdorf, Pilar Hernandez, Julia Ortmann, Jana-Kristin Heise, Stefanie Castell, Daniela Gornyk, Stephan Glöckner, Vanessa Melhorn, Yvonne Kemmling, Berit Lange, Alex Dulovic, Patrick Marsall, Julia Häring, Daniel Junker, Nicole Schneiderhan-Marra, Markus Hoffmann, Stefan Pöhlmann, Gérard Krause, Luka Cicin-Sain. “Diminished neutralization responses towards SARS-CoV-2 Omicron VoC after mRNA or vector-based COVID-19 vaccinations.” *Scientific Reports* 12, Article no: 19858 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22552-y>

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am NMI, dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen, in der Abteilung Multiplexe Immunoassays angefertigt.

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in dieser Zeit unterstützt haben.

**Prof. Dr. Ulrich Rothbauer** und **Prof. Dr. Katja Schenke-Layland** möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit an der Eberhard Karls Universität Tübingen und die Erstellung der Gutachten bedanken.

Bei **Dr. Nicole Schneiderhan-Marra** bedanke ich mich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Betreuung meiner Arbeit am NMI. Auch **Dr. Alex Dulovic** möchte ich für die Betreuung am NMI sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei **Dr. Harald Klein** und **Prof. Dr. Christoph von Eichel-Streiber** von der tgcBIOMICS GmbH für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antigene bedanken. Zudem bedanke ich mich bei **Tatia Tchitchagua** und **Dr. Olaf Leschnik** aus der Klinik für Neurologie des Sächsischen Krankenhaus Rodewisch für die Bereitstellung von CSF- und Serum-Proben. Danke auch an **Prof. Dr. Hayrettin Tumani** für die Bereitstellung von CSF/Serum-Paaren aus der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm und **Dr. Kathrin Brockmann** für die Erlaubnis zur Verwendung von CSF-Proben aus der Biobank des DZNE & Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung.

Zudem danke ich Prof. **Dr. Klaus Berger** und **Prof. Dr. André Karch** für die Erlaubnis Serum-Proben aus der MEMO-Studie zu verwenden. Ebenso bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Gérard Krause**, **Dr. Stefanie Castell** und **Dr. Monika Strengert** vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für die zur Verfügung gestellten Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei **Max Hassenstein** für die Zusammenstellung der dazugehörigen Metadaten.

Danke auch an all meine **Kollegen** am NMI für die tolle Zusammenarbeit und die vielen anregenden und hilfreichen Diskussionen zu meiner Arbeit. Vor allem danke ich **Matthias Becker** für seine Unterstützung bei der Herstellung der cut off - Proben und der statistischen Auswertung meiner Daten. **Johanna Griesbaum** und **Daniel Junker** danke ich besonders für ihr immer offenes Ohr und ihre Geduld bei all meinen Fragen.

Zu Letzt gilt mein Dank meinen **Eltern**, die mich bei allem was ich tue unterstützen, mir immer zur Seite stehen und mich daran erinnern, meine Ziele nicht aus den Augen zu verlieren.

**Vielen Dank!**

## Zusammenfassung / Abstract

Die Lyme-Borreliose ist die am häufigsten durch Zecken übertragene Infektionskrankheit der nördlichen Hemisphäre. Auslöser der Krankheit sind Erreger einer Gruppe eng verwandter Arten der Spirochäten-Gattung *Borrelia*. Die Gruppe umfasst mehr als 15 verschiedene Arten, wobei mindestens fünf davon humanpathogen sind. Die geografische Verteilung der einzelnen Arten ist unterschiedlich. In Europa kommen vor allem die Arten *B. afzelii* und *B. garinii* vor. Die Übertragung erfolgt über verschiedene Zeckenarten der Gattung *Ixodes*. Generell handelt es sich bei der Lyme-Borreliose um eine Systemerkrankung, die viele verschiedene Organe betreffen kann und mit einer Vielzahl an Manifestationen einhergeht. Das Erythema migrans (EM) gilt als häufigste Manifestation und tritt in der Regel in der frühen Infektionsphase um die Einstichstelle der Zecke auf. Von dort entwickelt sich zunächst eine lokale Infektion, bis sich der Erreger immer weiter im Körper ausbreitet. Ist das zentrale Nervensystem betroffen, wird von einer Neuroborreliose gesprochen. Die Diagnose der Lyme-Borreliose erfolgt hauptsächlich über das klinische Bild. Vor allem ein EM gilt als eindeutiges Zeichen für eine Infektion. Bei allen anderen Manifestationen ist zusätzlich eine serologische Diagnostik über ein 2-Stufen-Testverfahren (ELISA + Immunoblot) notwendig. Dabei kommt es jedoch vor allem in der frühen Infektionsphase auf Grund einer zu geringen Sensitivität der Tests und noch niedrigen Antikörpertitern häufig zu falsch-negativen Ergebnissen.

In dieser Arbeit wurden zwei multiplexe Immunoassays zum Nachweis einer humoralen Immunantwort bei einer Lyme-Borreliose (*Borrelia multiplex*) bzw. Neuroborreliose (*Borrelia neuroplex*) entwickelt. Dafür wurde die xMAP-Technologie verwendet, welche im Vergleich zu einem herkömmlichen ELISA den gezielten Nachweis einer Immunantwort gegen verschiedene *Borrelia*-Antigene ermöglicht. Der *Borrelia multiplex* wurde anschließend für Messungen im Hochdurchsatz automatisiert. Zudem wurde für den Assay die neue INTELLIFLEX Plattform verwendet, die den gleichzeitigen Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern ermöglicht. Ein Vergleich mit einem kommerziellen Bead-basierten Multiplextest ergab eine Sensitivität von 93,7 % und eine Spezifität von 96,5 %. Ein Vergleich mit einer 2-Stufen-Diagnostik bestätigte die hervorragende Genauigkeit des Assays. Der *Borrelia neuroplex*, mit dem eine parallele Quantifizierung des Chemokins CXCL13 sowie eine Differentialdiagnostik der Neurosyphilis möglich ist, zeigte bei den initialen Analysen ebenfalls eine hohe Sensitivität und Spezifität, wobei hier eine genaue Bestimmung durch das Fehlen gut charakterisierter Proben nur begrenzt möglich war.

Zusammenfassend ist es gelungen, zwei robuste multiplexe Tests zur Bestimmung des Serostatus bei einer Borrelien-Infektion zu entwickeln, die in ihrer Sensitivität und Spezifität mit den auf dem Markt befindlichen Borreliose-Tests mithalten können.

*Lyme borreliosis is the most common tick-borne infectious disease in the northern hemisphere. The disease is caused by pathogens of a group of closely related species of the spirochete genus Borrelia. The group includes more than 15 different species, of which at least five are human pathogens. The geographic distribution of each species varies, with B. afzelii and B. garinii being the most common species in Europe. Transmission occurs via various tick species of the genus Ixodes. In general, Lyme borreliosis is a systemic disease that can affect many different organs and is associated with a variety of manifestations. An erythema migrans (EM) is considered the most common symptom of Lyme disease and usually occurs in the early phase of infection around the site of the tick bite. From there, a local infection initially develops until the pathogen begins to spread throughout the body. If the central nervous system is affected, the disease is described as neuroborreliosis. Current diagnostics of Lyme disease is based upon clinical symptoms, with an EM considered a clear sign of infection. For all other manifestations, a serological analysis using a 2-step diagnostics (ELISA + immunoblot) is necessary. However, false-negative results are frequently obtained, especially in the early infection phase, due to low sensitivity of the tests and weak antibody titers.*

*In this work, two multiplex immunoassays for detecting the humoral immune response for Lyme borreliosis (Borrelia multiplex) and neuroborreliosis (Borrelia neuroplex) were developed. For this, the xMAP technology was used, which compared to a conventional ELISA allows the targeted detection of an immune response against different Borrelia antigens. The Borrelia multiplex was subsequently automated for high-throughput measurements and the new INTELLIFLEX platform allowing simultaneous detection of IgG and IgM antibodies was used. A comparison with a commercial bead-based multiplex assay resulted in a sensitivity of 93.7% and a specificity of 96.5%. A comparison with a 2-step diagnostics confirmed the excellent accuracy of the assay. The Borrelia neuroplex, which also allows quantification of the chemokine CXCL13 and differential diagnosis of neurosyphilis, also appeared to have high sensitivity and specificity, although here accurate determination was limited by the lack of well-characterized samples.*

*In summary, it was possible to develop two robust multiplex assays to determine the serostatus in Borrelia infection, which can compete in sensitivity and specificity with the existing Lyme borreliosis tests.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>I</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>II</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung / Abstract .....</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Formelverzeichnis.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XIX</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Lyme-Borreliose.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Vorkommen.....	1
1.1.2 Erreger.....	2
1.1.3 Infektionsweg / Pathogenese .....	5
1.1.4 Immunantwort .....	6
1.1.5 klinische Manifestationen .....	9
1.1.6 Diagnostik .....	11
1.1.7 Therapie.....	12
<b>1.2 Immunoassays .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 multiplexe Immunoassays .....	14
1.2.2 Validierung von Immunoassays.....	15
1.2.3 Immunoassays in der Lyme-Diagnostik.....	17
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>19</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>20</b>
3.1.1 Antigene / Peptide.....	20

---

3.1.2	Antikörper.....	21
3.1.3	Proben .....	22
3.1.4	kommerzielle Borreliose-Tests .....	23
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien.....	24
3.1.6	Puffer und Lösungen.....	25
3.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	26
3.1.8	Software.....	28
<b>3.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.2.1	Proteinanalysen mittels Prometheus NT.48.....	28
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	29
3.2.3	Immobilisierung von Proteinen an MagPlex Mikrosphären .....	30
3.2.4	Immobilisierung von Peptiden an MagPlex Mikrosphären.....	34
3.2.5	Biotinylierung von Proteinen.....	36
3.2.6	PE-Konjugation von Proteinen .....	37
3.2.7	Multiplexe Immunoassays .....	38
3.2.8	Datenanalyse .....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	<b>Auswahl der <i>Borrelia</i>-Antigene .....</b>	<b>49</b>
4.2	<b>Detektion der Immunantwort bei einer Lyme-Borreliose (<i>Borrelia multiplex</i>).....</b>	<b>55</b>
4.2.1	Assay-Entwicklung .....	55
4.2.2	technische Assay-Validierung .....	59
4.2.3	klinische Assay-Validierung.....	65
4.2.4	Assay-Automatisierung .....	69
4.2.5	Assay-Präzision .....	71
4.2.6	Messung von Serum-Proben der MuSPAD-Studie .....	74

---

<b>4.3</b>	<b>Detektion der Immunantwort bei einer Neuroborreliose (Borrelia neuroplex)</b> .....	<b>76</b>
4.3.1	Assay-Entwicklung .....	76
4.3.2	technische Assay-Validierung .....	84
4.3.3	klinische Assay-Validierung .....	97
4.3.4	Assay-Präzision .....	101
4.3.5	Messung von CSF/Serum-Paaren .....	102
4.3.6	Integration von <i>Treponema</i> -Antigenen .....	106
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>107</b>
<b>5.1</b>	<b>Bedeutung der Serologie in der Borreliose-Diagnostik</b> .....	<b>107</b>
<b>5.2</b>	<b>Antigen-Auswahl für den Borrelia multiplex / neuroplex</b> .....	<b>108</b>
<b>5.3</b>	<b>Anwendbarkeit des Borrelia multiplex</b> .....	<b>111</b>
5.3.1	Stabilität des Borrelia multiplex .....	111
5.3.2	Assay-Präzision des Borrelia multiplex .....	112
5.3.3	Seropositivität gegenüber <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato in Deutschland .....	114
<b>5.4</b>	<b>Anwendbarkeit des Borrelia neuroplex</b> .....	<b>116</b>
5.4.1	IgG/IgM-Detektion im CSF .....	116
5.4.2	diagnostische Wertigkeit des Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex .....	116
5.4.3	CXCL13 als diagnostischer Marker der Neuroborreliose .....	117
5.4.4	Differentialdiagnostik - Neurosyphilis .....	119
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerung / Ausblick</b> .....	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>133</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Antigene in der Borreliose-Diagnostik.....	18
Tabelle 3-1: <i>Borrelia</i> -Antigene.....	20
Tabelle 3-2: <i>Treponema</i> -Antigene.....	20
Tabelle 3-3: Peptide.....	21
Tabelle 3-4: unkonjugierte Antikörper.....	21
Tabelle 3-5: konjugierte Antikörper. ....	21
Tabelle 3-6: Central BioHub Probensets. ....	22
Tabelle 3-7: kommerzielle Borreliose-Tests. ....	24
Tabelle 3-8: Chemikalien und Reagenzien.....	24
Tabelle 3-9: Puffer und Lösungen. ....	25
Tabelle 3-10: Geräte. ....	26
Tabelle 3-11: Verbrauchsmaterial. ....	27
Tabelle 3-12: Software.....	28
Tabelle 3-13: Kopplungskonzentrationen der KingFisher-Immobilisierung. ....	32
Tabelle 3-14: Immobilisierungsschritte der KingFisher-Immobilisierung. ....	32
Tabelle 3-15: Volumina der KingFisher-Immobilisierung. ....	33
Tabelle 3-16: Biotin-Menge und -Konzentration für die Antikörper- Biotinylierung. ....	36
Tabelle 3-17: STD-Kurvenpunkte CXCL13.....	42
Tabelle 4-1: Sequenzalignment für die Antigene der einzelnen Borrelien-Arten. ....	50
Tabelle 4-2: Vergleich des Antigens VlsE - B31 mit synthetisierten VlsE- Peptiden. ....	53
Tabelle 4-3: Vergleich der verschiedenen OspC-Antigene mit synthetisierten OspC-Peptiden. ....	53
Tabelle 4-4: Detektionsgrenzen (LODs) der Antigene im <i>Borrelia</i> multiplex. ....	59
Tabelle 4-5: Intra-assay Präzision des <i>Borrelia</i> multiplex. ....	60
Tabelle 4-6: Inter-assay Präzision des <i>Borrelia</i> multiplex. ....	61



---

Tabelle 4-7: Sensitivität und Spezifität des <i>Borrelia multiplex</i> im Vergleich zum kommerziellen Test recomBead <i>Borrelia</i> IgG/IgM 2.0. ....	72
Tabelle 4-8: Sensitivität und Spezifität des <i>Borrelia multiplex</i> im Vergleich zur konventionellen 2-Stufen-Diagnostik. ....	73
Tabelle 4-9: Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion - biotinylierte Antikörper. ....	77
Tabelle 4-10: Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion - PE-konjugierte Antikörper. ....	78
Tabelle 4-11: Detektionsgrenzen (LODs) der <i>Borrelia</i> -Antigene im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	84
Tabelle 4-12: Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (LLOQ) des CXCL13 im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	86
Tabelle 4-13: Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) des CXCL13 im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	87
Tabelle 4-14: Intra-assay Präzision der IgG/IgM-Detektion des <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	88
Tabelle 4-15: Inter-assay Präzision der IgG/IgM-Detektion des <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	88
Tabelle 4-16: Spike-in Wiederfindung der CXCL13-Detektion - CSF-Validierungsprobe 5. ....	89
Tabelle 4-17: Spike-in Wiederfindung der CXCL13-Detektion - CSF-Validierungsprobe 6. ....	90
Tabelle 4-18: CXCL13-Verdünnungslinearität im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	90
Tabelle 4-19: Parallelität der CSF-Probenverdünnung im <i>Borrelia neuroplex</i> (CXCL13-Detektion). ....	92
Tabelle 4-20: Cut offs der <i>Borrelia</i> -Antigene bei CSF-Proben im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	97
Tabelle 4-21: Sensitivität und Spezifität der IgG/IgM-Detektion des <i>Borrelia neuroplex</i> bei Serum-Proben. ....	101
Tabelle 4-22: Messung von CSF/Serum-Paaren der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm. ....	103

---

Tabelle 4-23: Messung von CSF/Serum-Paaren aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch.....	105
Tabelle 7-1: Cohen's Kappa Koeffizienten aus dem Vergleich des Borrelia multiplex mit kommerziellen Borreliose-Tests. ....	142
Tabelle 7-2: Absolute Werte und Prozente aus der Analyse von Serum-Proben der MuSPAD-Studie.....	143

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: geografische Verteilung der Zecken-Vektoren von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	2
Abbildung 1-2: pleomorphe Formen von <i>B. burgdorferi</i> s.s. B31.....	3
Abbildung 1-3: Morphologie und zelluläre Architektur der Borrelien.....	4
Abbildung 1-4: Antikörper - Grundgerüst und Klassen.....	7
Abbildung 1-5: Verlauf der IgG/IgM-Antwort bei einer Borrelien-Infektion.....	8
Abbildung 1-6: Erythema migrans.....	9
Abbildung 1-7: Borrelien-Lymphozytom.....	10
Abbildung 1-8: Acrodermatitis chronica atrophicans.....	11
Abbildung 1-9: Sandwich-Assay zur Detektion eines Antigens bzw. Antikörpers.....	14
Abbildung 1-10: xMAP-Technologie der Luminex Corporation (FLEXMAP 3D Plattform).....	15
Abbildung 3-1: Chemische Reaktionen der EDC / sNHS Chemie.....	30
Abbildung 3-2: Strukturformel von sulfo-SMPB.....	35
Abbildung 3-3: Unterteilung eines Datensatzes durch Quartile.....	44
Abbildung 3-4: Beispielhaftes Reiber-Diagramm für IgG- bzw. IgM-Antikörper.....	47
Abbildung 4-1: Proteinanalyse des Antigens DbpA - A14S.....	51
Abbildung 4-2: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - I.....	54
Abbildung 4-3: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - I.....	56
Abbildung 4-4: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - I.....	57
Abbildung 4-5: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion - I.....	58
Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Borrelia multiplex auf zwei Luminex-Plattformen.....	58
Abbildung 4-7: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - I.....	62

---

Abbildung 4-8: Gefrierzyklus-Stabilität von Proben im <i>Borrelia multiplex</i> .....	63
Abbildung 4-9: Kurzzeit- und Temperaturstabilität von Proben im <i>Borrelia multiplex</i> . ....	64
Abbildung 4-10: ROC-Analysen - IgM-dominante Antigene des <i>Borrelia multiplex</i> . ....	65
Abbildung 4-11: ROC-Analysen - IgG-dominante Antigene des <i>Borrelia multiplex</i> . ....	66
Abbildung 4-12: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale der MEMO-Proben im <i>Borrelia multiplex</i> . ....	67
Abbildung 4-13: Box-Whisker-Plots der IgM-Signale der MEMO-Proben im <i>Borrelia multiplex</i> . ....	68
Abbildung 4-14: Probenklassifizierung - <i>Borrelia multiplex</i> . ....	69
Abbildung 4-15: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des <i>Borrelia multiplex</i> - I.....	70
Abbildung 4-16: Analyse von Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie. ....	75
Abbildung 4-17: STD-Kurven der geeignetsten Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion. ....	79
Abbildung 4-18: STD-Kurven des CXCL13 bei unterschiedlichen Pufferbedingungen.....	80
Abbildung 4-19: Effekt des HAMA-Blockers auf die CXCL13-Detektion. ....	80
Abbildung 4-20: Einsatz eines RF-Absorbens bei der Probenverdünnung. ....	81
Abbildung 4-21: STD-Kurven des CXCL13 bei unterschiedlichen Assayformaten. ....	82
Abbildung 4-22: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assayformaten - I.....	83
Abbildung 4-23: Schematische Darstellung des <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	83
Abbildung 4-24: Regressionsgerade zur LOD-Berechnung für die CXCL13-Detektion im <i>Borrelia neuroplex</i> . ....	85
Abbildung 4-25: Parallelität der CSF-Probenverdünnung im <i>Borrelia neuroplex</i> (IgG/IgM-Detektion) - I. ....	91

---

Abbildung 4-26: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im <i>Borrelia neuroplex</i> - I.....	93
Abbildung 4-27: Gefrierzyklus-Stabilität im <i>Borrelia neuroplex</i> .....	95
Abbildung 4-28: Kurzzeit- und Temperaturstabilität von Proben im <i>Borrelia neuroplex</i> .....	96
Abbildung 4-29: ROC-Analysen - IgM-dominante Antigene des <i>Borrelia neuroplex</i> .....	98
Abbildung 4-30: ROC-Analysen - IgG-dominante Antigene des <i>Borrelia neuroplex</i> .....	99
Abbildung 4-31: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale der MEMO-Proben im <i>Borrelia neuroplex</i> .....	100
Abbildung 4-32: CXCL13-Konzentration bei CSF-Verlaufproben.....	104
Abbildung 4-33: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale bei <i>Treponema</i> -negativen und -positiven Proben.....	106
Abbildung 7-1: Probenmessung mit kommerziellen Borreliose-Tests.....	144
Abbildung 7-2: Proteinanalysen des Antigens BmpA - PKo.....	145
Abbildung 7-3: Proteinanalysen des Antigens DbpA - ZS7.....	145
Abbildung 7-4: Proteinanalysen des Antigens DbpA - 20047.....	146
Abbildung 7-5: Proteinanalysen des Antigens DbpA - PKo.....	146
Abbildung 7-6: Proteinanalysen des Antigens DbpA - PBi.....	147
Abbildung 7-7: Proteinanalysen des Antigens OspA - PKo.....	147
Abbildung 7-8: Proteinanalysen des Antigens OppA-2 - PBi.....	148
Abbildung 7-9: Proteinanalysen des Antigens OspC - B31.....	148
Abbildung 7-10: Proteinanalysen des Antigens OspC - 20047.....	149
Abbildung 7-11: Proteinanalysen des Antigens OspC - A14S.....	149
Abbildung 7-12: Proteinanalysen des Antigens OspC - PKo.....	150
Abbildung 7-13: Proteinanalysen des Antigens OspC - PBi.....	150
Abbildung 7-14: Proteinanalysen des Antigens p41i - PKo.....	151
Abbildung 7-15: Proteinanalysen des Antigens p83/100 - PKo.....	151

---

Abbildung 7-16: Proteinanalysen des Antigens VlsE - B31. ....	152
Abbildung 7-17: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - II. ....	153
Abbildung 7-18: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - III. ....	154
Abbildung 7-19: Reinheitskontrolle der final verwendeten Antigen-Batches. ....	155
Abbildung 7-20: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - II. ....	156
Abbildung 7-21: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - III. ....	157
Abbildung 7-22: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421- Detektionssystem - II. ....	158
Abbildung 7-23: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421- Detektionssystem - III. ....	159
Abbildung 7-24: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM- Detektion - II. ....	160
Abbildung 7-25: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM- Detektion - III. ....	161
Abbildung 7-26: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - II. ....	162
Abbildung 7-27: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - III. ....	163
Abbildung 7-28: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - II. ....	164
Abbildung 7-29: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - III. ....	165
Abbildung 7-30: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay- Formaten - II. ....	167
Abbildung 7-31: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay- Formaten - III. ....	168
Abbildung 7-32: Parallelität der CSF-Probenverdünnung Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - II. ....	169
Abbildung 7-33: Parallelität der CSF-Probenverdünnung Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - III. ....	170

---

Abbildung 7-34: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex - II.....	171
Abbildung 7-35: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex - III.....	172

## Formelverzeichnis

Formel 1: Sensitivität % .....	45
Formel 2: Spezifität % .....	45
Formel 3: PPV % .....	45
Formel 4: NPV % .....	45
Formel 5: $Q_{Lim}$ .....	46
Formel 6: Grenze $Q_{Alb}$ .....	47
Formel 7: IF .....	47
Formel 8: $Q_{spez.}$ .....	48
Formel 9: AI .....	48



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
a	anti
AB	Antibiotika
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
AI	Borrelie-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex
AUC	area under the curve (Fläche unterhalb der Kurve)
BSA	bovines Serumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421
CSF	cerebrospinal fluid (Zerebrospinalflüssigkeit, Liquor)
CV	coefficient of variation (Variationskoeffizient)
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dk	donkey (Esel)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EM	Erythema migrans
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
gt	goat (Ziege)
h	hour (Stunde)
HAMA	Human-Anti-Maus-Antikörper
HCl	Salzsäure
hu	human (Mensch)
Ig	Immunglobulin
IQR	interquartile range (Interquartilabstand)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LLOQ	Lower Limit of Quantification (untere Bestimmungsgrenze)
LOD	Limit of Detection (Detektionsgrenze)
LTT	Lymphozytentransformationstest
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

---

µm	Mikrometer
min	minute (Minute)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	median fluorescence intensity (mediane Fluoreszenzintensität)
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ms	mouse (Maus)
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nmol	nanomol
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
rb	rabbit (Kaninchen)
RF	Rheumafaktor
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	second (Sekunde)
sNHS	N-hydroxysulfosuccimid
Tagg	aggregation temperature (Aggregationstemperatur)
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
T <sub>m</sub>	melting temperature (Schmelztemperatur)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULOQ	Upper Limit of Quantification (obere Bestimmungsgrenze)
V	Volt

# 1 Einleitung

## 1.1 Lyme-Borreliose

Bei der Lyme-Borreliose handelt es sich um eine durch Bakterien ausgelöste Multiorganerkrankung<sup>1,2</sup>. Sie wurde erstmals 1975 nach einem gehäuften Auftreten von Gelenkentzündungen in Verbindung mit Zeckenstichen in den Orten Lyme und Old Lyme beschrieben<sup>3,4</sup>. Im Jahr 1982 gelang es dann dem amerikanischen Bakteriologen Willy Burgdorfer als erstes den bis dahin unbekanntem Erreger zunächst aus einer Zecke und später auch aus Patientenproben zu isolieren und anzuzüchten<sup>3,4</sup>. In zu Ehren wurde die entdeckte Art als *Borrelia burgdorferi* bezeichnet<sup>4,5</sup>.

### 1.1.1 Vorkommen

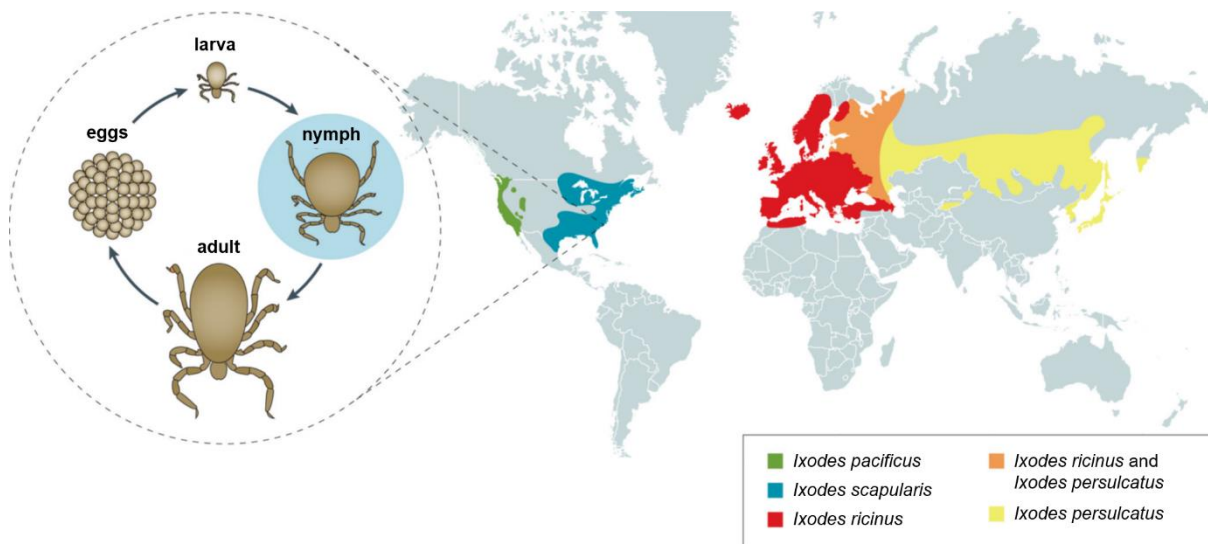
Die Lyme-Borreliose ist die am häufigsten durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre<sup>3,6,7</sup>. Sie kommt in Nordamerika und ganz Europa sowie in Teilen Nordafrikas und im Norden Asiens vor<sup>8</sup>.

Einen Überblick über die Häufigkeit der Borreliose in West-Europa bietet die Studie von Sykes & Makiello<sup>9</sup> aus dem Jahr 2016. In dieser Studie wurden Inzidenzdaten (Zahl an Fällen / 100.000 Einwohner) aus Übersichtsarbeiten und Überwachungsberichten aus insgesamt 17 Ländern zusammengetragen und miteinander verglichen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Inzidenz zwischen den verschiedenen Ländern, wobei manche Länder bereits als Endemiegebiete bezeichnet wurden. Die höchste Inzidenz lag in Schweden vor (464 / 100.000), die niedrigste Inzidenz in Italien (0,001 / 100.000)<sup>9</sup>. Auch in manchen osteuropäischen Ländern, wie z.B. der Tschechischen Republik, ist die Lyme-Borreliose endemisch. So wurden in der Tschechischen Republik in den Jahren 2018 und 2019 je nach Region mehr als 100 Fälle pro 100.000 Einwohner registriert<sup>10</sup>.

In Deutschland muss in allen Bundesländern von einer Infektionsgefährdung ausgegangen werden<sup>11</sup>. Die genaue Häufigkeit der Lyme-Borreliose ist jedoch unter anderem auf Grund einer fehlenden Meldepflicht in 7 von 16 Bundesländern nicht bekannt<sup>12</sup>. Eine Studie basierend auf Daten aus den neun Bundesländern mit einer Meldepflicht berichtet von 56.446 neuen Fällen zwischen 2013 und 2017<sup>12</sup>. Eine andere Studie aus dem Jahr 2007 / 2008, welche auf Abrechnungen einer deutschen Krankenkasse basiert, rechnet mit 214.000 neuen Fällen pro Jahr<sup>13</sup>. Laut dem aktuellen Versorgungsatlas aus dem Jahr 2021 ist anhand von vertragsärztlichen Abrechnungsdaten aus den Jahren 2010 bis 2019 jährlich sogar von mehr als 300.000 neuen Patienten mit einer Lyme-Borreliose auszugehen<sup>14</sup>.

### 1.1.2 Erreger

Bei den Erregern der Lyme-Borreliose handelt es sich um eine Gruppe eng verwandter Arten der Spirochäten-Gattung *Borrelia* (bekannt als *Borrelia burgdorferi* sensu lato)<sup>15,16</sup>. Die Gruppe umfasst mehr als 15 verschiedene Arten, wobei mindestens fünf davon humanpathogen sind. Es handelt sich dabei um die Arten *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis*<sup>1,15,16</sup>. Die einzelnen Arten werden von verschiedenen Zeckenarten übertragen und unterscheiden sich dadurch in ihrer geografischen Verbreitung<sup>1</sup>. So ist in Nordamerika ausschließlich die Art *B. burgdorferi* s.s. zu finden<sup>1,15</sup>. Sie wird dort durch die Zeckenarten *Ixodes pacificus* (Westküste) und *Ixodes scapularis* (Ostküste) übertragen<sup>1,17</sup>. Die Hauptarten in Europa sind *B. afzelii* und *B. garinii*<sup>15,18</sup>, wobei auch die Art *B. burgdorferi* s.s. sowie die zu Letzt entdeckten Arten *B. spielmanii* und *B. bavariensis* (früher *B. garinii* OspA-Typ 4<sup>6,18</sup>) vorkommen<sup>1,15,18</sup>. Eine Übertragung erfolgt in Europa durch die Zeckenart *Ixodes ricinus*<sup>1,17</sup>. In Asien sind vor allem die Arten *B. afzelii* und *B. garinii* verbreitet, aber auch die Art *B. bavariensis* ist zu finden<sup>1</sup>. Vektor ist hier die Art *Ixodes persulcatus*<sup>1,17</sup>. Abbildung 1-1 gibt eine Übersicht über die geografische Verteilung der Zeckenvektoren. Zudem ist in der Abbildung auch der Lebenszyklus der Zecke dargestellt. Als Hauptvektor gelten vor allem Nymphen<sup>17-19</sup>.



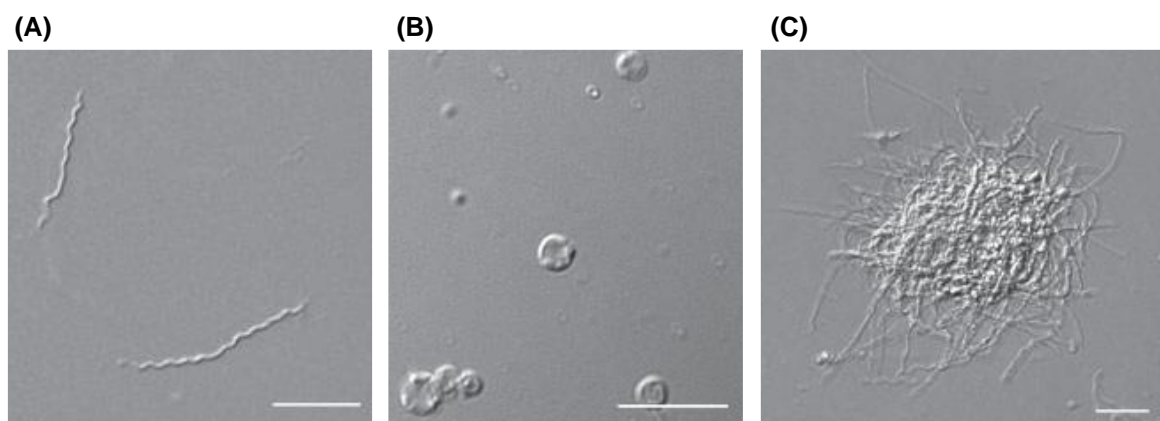
**Abbildung 1-1: geografische Verteilung der Zecken-Vektoren von *Borrelia burgdorferi* sensu lato.**

Borrelien werden durch verschiedene Zeckenarten übertragen. Die Zeckenarten *Ixodes pacificus* und *Ixodes scapularis* sind für die Übertragung des Erregers *B. burgdorferi* s.s. in Nordamerika verantwortlich. In Europa überträgt die Zeckenart *Ixodes ricinus* hauptsächlich die Erreger *B. afzelii* und *B. garinii*. Eine Übertragung der drei anderen humanpathogenen Erreger (*B. burgdorferi* s.s., *B. spielmanii* und *B. bavariensis*) ist jedoch auch möglich. In Asien werden die Erreger *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bavariensis* durch die Zeckenart *Ixodes persulcatus* übertragen. Nymphen gelten bei der Übertragung generell als Hauptvektor. [mit Genehmigung entnommen aus Steere et al. (2016)<sup>17</sup>, Schriftformat angepasst]

Des Weiteren sind die verschiedenen Borrelien-Arten genetisch und immunologisch sehr heterogen und können unterschiedliche klinische Manifestationen hervorrufen<sup>1</sup>. Eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. führt z.B. hauptsächlich zu einer Lyme-Arthritis. Bei einer Infektion mit den Erregern *B. afzelii* oder *B. spielmanii* dagegen kommt es häufig zu Hautmanifestationen. Die Arten *B. garinii* und *B. bavariensis* sind vor allem für eine Neuroborreliose bekannt<sup>1,3</sup>.

### Morphologie

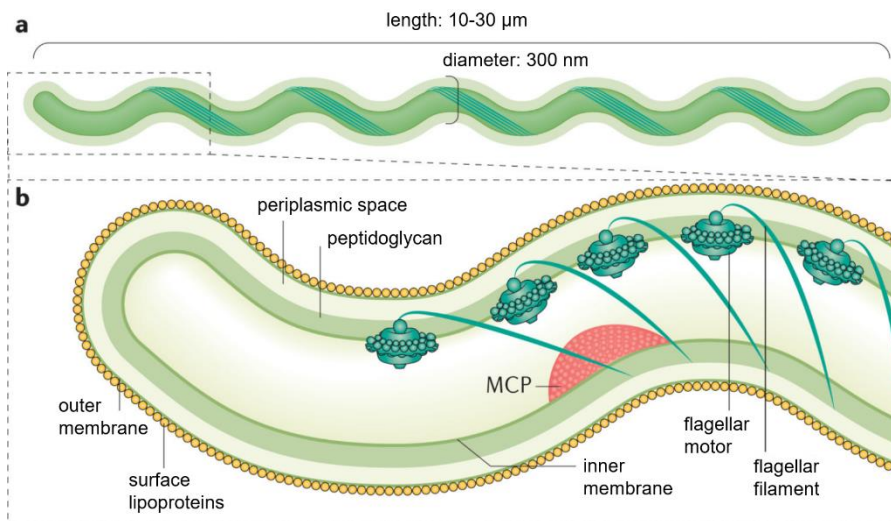
Generell handelt es sich bei Borrelien um gramnegative schraubenförmige Bakterien mit einer Länge von 10 - 30  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 0,25 - 0,5  $\mu\text{m}$ <sup>3,20</sup>. Abbildung 1-2 zeigt eine mikroskopische Aufnahme des Bakteriums *B. burgdorferi* s.s. B31. Neben der typischen Spirochäten-Form in Abbildung 1-2 (A) sind auch andere pleomorphe Formen möglich. Diese wurden bisher hauptsächlich in vitro untersucht, können jedoch auch in vivo gefunden werden<sup>21,22</sup>. So können Borrelien z.B. auch eine runde Form<sup>23,24</sup> wie in Abbildung 1-2 (B) annehmen oder Biofilm-ähnlichen Aggregate<sup>25,26</sup> wie in Abbildung 1-2 (C) bilden. Als Ursache für die verschiedenen Erscheinungsformen wird eine Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen vermutet<sup>22</sup>.



**Abbildung 1-2: pleomorphe Formen von *B. burgdorferi* s.s. B31.**

Borrelien haben normalerweise eine typische schraubenartige Form (A). Als Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen können sie jedoch unter anderem auch eine runde Form (B) annehmen oder Biofilm-ähnliche Aggregate (C) bilden. Bei den Aufnahmen handelt es sich um Lebendzellbilder des Erregers *B. burgdorferi* s.s. B31. Es wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit Differentialinterferenzkontrast verwendet. Der eingezeichnete Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ . [entnommen aus Meriläinen et al. (2015)<sup>23</sup>]

Die Zellwand der Borrelien (Abbildung 1-3) besteht aus einer äußeren und einer inneren Membran. In der äußeren Membran befinden sich viele Oberflächenlipoproteine (z.B. VlsE, OspA, OspC). Lipopolysaccharide wie bei den meisten anderen Bakterien sind nicht vorhanden<sup>17,19</sup>. Die innere Membran ist reich an integralen Membranproteinen<sup>19</sup>. Im periplasmatischen Raum zwischen den Membranen befinden sich Flagellen, welche sich um den Zellzylinder winden und an den Zellpolen mit Flagella-Motoren verbunden sind<sup>17</sup>. Dadurch können sich die Borrelien flexibel zusammenziehen und somit fortbewegen<sup>3,19</sup>.



**Abbildung 1-3: Morphologie und zelluläre Architektur der Borrelien.**

Borrelien sind gramnegative schraubenförmige Bakterien mit einer Länge von 10 - 30 µm und einem Durchmesser von 0,25 - 0,5 µm. Ihre Zellwand besteht aus einer äußeren und inneren Membran. Die äußere Membran ist reich an Oberflächenlipoproteinen. Zwischen den Membranen befindet sich eine dünne Peptidoglykan-Schicht sowie der periplasmatische Raum. In diesem liegen die Flagellen, welche sich um den Zellzylinder wickeln und eine rotierende Bewegung der Borrelien ermöglichen. Die Flagellen sind an den Zellpolen mit Flagella-Motoren verbunden. [mit Genehmigung entnommen aus Steere et al. (2016)<sup>17</sup>, Schriftformat angepasst]

## Genom

Das Genom der Borrelien gilt als äußerst kompliziert und zeichnet sich durch ein hohes Maß an Redundanz aus<sup>19</sup>. Es besteht aus einem ~950 kb langen linearen Chromosom sowie verschiedenen linearen und zirkulären Plasmiden zwischen 5 und 56 kb<sup>27</sup>. Das Chromosom ist innerhalb der Gattung *Borrelia* weitgehend konserviert und besitzt die meisten so genannten „housekeeping“-Gene<sup>19</sup>. Diese werden durchgehend exprimiert und gelten als wesentlich für die zelluläre Existenz<sup>28</sup>. Die Plasmide dagegen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Borrelien-Arten. Sie tragen vor allem Gene, welche für die Infektiosität und Immunogenität wichtig sind. Darunter befinden sich auch Gene für unterschiedliche Oberflächenproteine<sup>19</sup>.

## Metabolismus

Auf Grund des parasitären Lebensstils sind die metabolischen Fähigkeiten der Borrelien stark reduziert. Sie sind auxotroph für alle Aminosäuren, Nukleotide und Fettsäuren und es fehlen ihnen Gene für die Enzyme des Citrat-Zyklus sowie die oxidative Phosphorylierung. Die Energie-Gewinnung erfolgt durch Fermentation von Zucker zu Milchsäure über den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse)<sup>19,27</sup>. Für die Aufnahme von Peptiden besitzen Borrelien ein Opp-Transportsystem, welches zur Superfamilie der ABC-Transporter gehört und aus einem Peptid-bindenden Protein (OppA), zwei Transmembranproteinen (OppB und OppC) sowie zwei ATP-bindenden Proteinen (OppD und OppF) besteht<sup>29,30</sup>. Im Gegensatz zu *E. coli*,

welches ebenfalls über ein Opp-Transportsystem verfügt, besitzen Borrelien drei verschiedene OppA-Protein (OppA-1, OppA-2, OppA-3)<sup>29</sup>. Diese unterscheiden sich in ihrer Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten, was vermutlich eine Anpassung an unterschiedliche Bedingungen in der Zecke und dem Menschen ermöglicht<sup>30</sup>.

### 1.1.3 Infektionsweg / Pathogenese

Borrelien werden über verschiedene Zeckenarten der Gattung *Ixodes* übertragen. Die Übertragung kann bereits in den ersten 24 h nach einem Zeckenbiss erfolgen<sup>1,31</sup>.

Um sich an die unterschiedlichen Bedingungen in der Zecke und dem Menschen anzupassen und dem Immunsystem des jeweiligen Wirts zu entgehen, haben Borrelien unterschiedliche Strategien entwickelt<sup>32,33</sup>. Eine davon ist die Regulierung ihrer Genexpression<sup>7,17</sup>. In einer ungesättigten Zecke befinden sich die Borrelien im Mitteldarm. Dort exprimieren sie das Oberflächenlipoprotein OspA, mit dem sie an die Darmwand der Zecke adhären<sup>7,31</sup>. Kommt es zur Blutaufnahme durch die Zecke, wird die Expression des OspA auf Grund der ausgelösten Temperatur- und pH-Änderung eingestellt<sup>7,34</sup>. Stattdessen wird das Oberflächenlipoprotein OspC exprimiert, welches ein wichtiger Virulenzfaktor für die Dissemination im Menschen ist<sup>7,34</sup>. Die Borrelien wandern aus dem Darm in die Speicheldrüsen und werden über den Speichel der Zecke auf den Menschen übertragen<sup>35</sup>. Bei einer persistierenden Infektion wird die OspC-Expression wieder reguliert und das OspC an der Zelloberfläche durch das Protein VlsE ersetzt<sup>17</sup>. Das VlsE kann von Borrelien durch eine Genkonversion im *vlsE*-Lokus in unterschiedlichen Variationen exprimiert werden<sup>17,33</sup>. Dies führt zu einer erschwerten Erkennung durch spezifische Antikörper und soll eine starke Immunreaktion verhindern<sup>17,33</sup>.

Nach der Übertragung auf den Menschen kommt es zunächst zu einer lokalen Infektion um die Stelle des Zeckenbisses<sup>7,17</sup>. Immunmodulierende Moleküle im Speichel der Zecke schützen die Borrelien hier durch Inhibierung des Komplementsystems vor einer Immunreaktion<sup>22</sup>. So bindet z.B. das Speichelprotein Salp15 an das OspC der Borrelien und verhindert so eine Antikörper- oder Komplement-vermittelte Abtötung dieser<sup>22,36</sup>. Durch Abbau der extrazellulären Matrix gelangen die Borrelien dann in den Blutkreislauf, von wo aus sie sich im Körper ausbreiten<sup>19</sup>. Da Borrelien keine eigenen Enzyme zum Abbau der extrazellulären Matrix besitzen, nutzen sie die vorhandenen Wirtsproteasen<sup>19,33</sup>. So sind sie in der Lage durch bestimmte Proteine (z.B. OspA oder OspC<sup>22,37</sup>) Plasminogen in Plasmin umzuwandeln. Plasmin sorgt als Serinprotease für den Abbau von Fibronectin, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix<sup>37</sup>. Auch sind die Bakterien in der Lage Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zu aktivieren<sup>19,37</sup>. Zusätzlich exprimieren Borrelien verschiedene Proteine, die über die Interaktion mit Zellrezeptoren (z.B. Integrine) oder Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Proteoglykane oder Glykoproteine) eine Adhäsion an verschiedene

Wirtsgewebe vermitteln und somit eine Infiltration ermöglichen<sup>19</sup>. So werden Integrine z.B. durch das Protein p66 gebunden. Das Protein DbpA bindet das Proteoglykan Decorin und das Glykoprotein Laminin wird durch das Protein BmpA gebunden<sup>19</sup>. Die Bindung dient gleichzeitig auch als Maskierung und schützt die Borrelien vor einer Erkennung durch das Immunsystem<sup>33</sup>.

#### 1.1.4 Immunantwort

Eine Erkennung der Borrelien durch das Immunsystems erfolgt in erster Linie über so genannte Pattern-Recognition-Rezeptoren, wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLRs). Diese befinden sich auf der Oberfläche verschiedenen Immunzellen und erkennen so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs)<sup>17,22,32</sup>. Dabei handelt es sich um Strukturen, die für das Überleben oder die Funktion eines Erregers notwendig sind und daher nicht so einfach von diesem verändert werden können<sup>38</sup>. Durch die Bindung an PAMPs werden in der Immunzelle verschiedene Signalkaskaden aktiviert und es kommt zu einer Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen. Dadurch werden weiter Abwehrzellen des Immunsystems angelockt, die dann zielgerichtet gegen die Borrelien vorgehen<sup>22,32</sup>. Eine Eliminierung der Borrelien erfolgt letztendlich über die Komplement-vermittelte Lyse<sup>7</sup>.

Allgemein ist das Immunsystem in der Lage die Anzahl der Spirochäten so zu reduzieren, dass Symptome ausbleiben oder auch ohne eine Therapie verschwinden. Dabei kann es jedoch vorkommen, dass einige Spirochäten in lokalisierten Nischen überleben und es Jahre nach einer Infektion zu einem (erneuten) Ausbruch der Lyme-Borreliose kommt<sup>17</sup>.

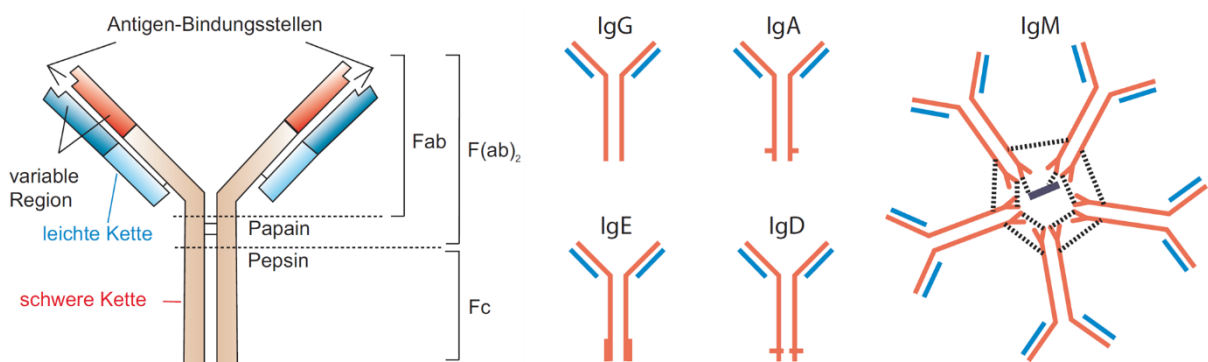
#### humorale Immunantwort

Bei der humoralen Immunantwort handelt es sich um eine Antikörper-vermittelte Immunreaktion<sup>39,40</sup>. Die Antikörper (Immunglobuline) haben dabei drei Aufgaben. So sind sie dafür verantwortlich durch Bindung eines Erregers im extrazellulären Raum, diesen zu neutralisieren und somit seine Ausbreitung im Körper zu verhindern. Zudem helfen sie im Zuge der Opsonierung Erreger zu markieren, so dass diese durch Abwehrzellen (z.B. Makrophagen) besser erkannt und phagozytiert werden. Final sind sie durch die Interaktion mit Proteinen des Komplementsystems an dessen Aktivierung beteiligt<sup>39</sup>.

Insgesamt wird zwischen fünf Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) unterschieden. Die Unterscheidung erfolgt unter anderem über das Molekulargewicht und die Struktur der Antikörper, wobei bei allen ein Y-förmiges Grundgerüst (Abbildung 1-4) vorhanden ist<sup>41</sup>. Dieses besteht aus zwei identischen leichten sowie zwei identischen schweren Polypeptidketten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind<sup>39,40</sup>. Die leichten Ketten haben eine Molekularmasse von 25.000<sup>40</sup> Da und sind entweder vom Typ  $\kappa$  oder  $\lambda$ . Hier ist keine Unterscheidung zwischen den Klassen möglich. Bei den schweren Ketten dagegen richtet sich der Typ nach der Klasse des Antikörpers (IgG:  $\gamma$ , IgM:  $\mu$ , IgA:  $\alpha$ , IgD:  $\delta$ , IgE:  $\epsilon$ )<sup>39,40</sup>.



Die Molekularmasse liegt bei 50.000 - 70.000 Da<sup>40</sup>. Generell kann bei beiden Ketten zwischen einer variablen und einer konstanten Region unterschieden werden<sup>40</sup>. Bei der variablen Region handelt es sich jeweils um einen kompakt gefalteten Abschnitt, der bereits innerhalb der Antikörperklasse in seiner Aminosäuresequenz stark variiert und dadurch für die Spezifität eines Antikörpers verantwortlich ist<sup>39</sup>. Die konstante Region dagegen ist in ihrer Aminosäuresequenz innerhalb einer Antikörperklasse stark konserviert. Über die schweren Ketten dieser Region können die Antikörper mit anderen Zellen des Immunsystems interagieren<sup>39</sup>. Die genaue biologische Funktion der Region richtet sich nach der Antikörperklasse. Bei Antikörpern der Klasse G oder M wird sie z.B. zu Aktivierung des Komplementsystems benötigt. Bei Antikörpern der Klasse E dagegen dient sie zur Bindung an Mastzellen<sup>40</sup>. Die schweren Ketten der konstanten Region werden auch als Fc-Fragment bezeichnet. Es wird bei einem Verdau mit Pepsin von dem F(ab)<sub>2</sub>-Fragment abgespalten. Dieses umfasst die beiden Antigen-Bindestellen und wird bei einem Papain-Verdau in zwei einzelne Fab-Fragmente unterteilt<sup>40,41</sup>.

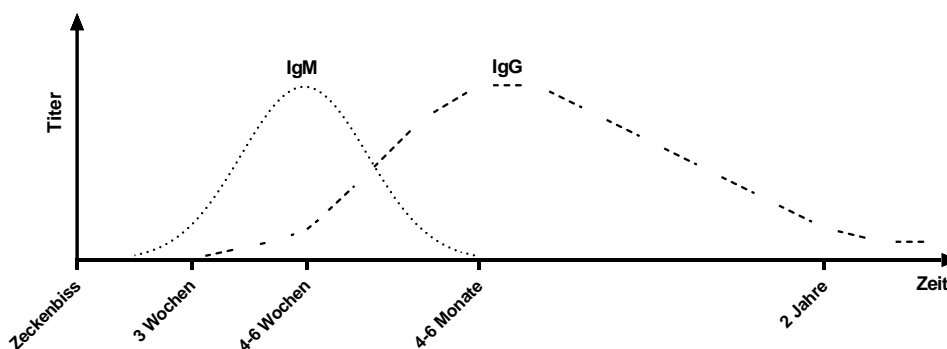


**Abbildung 1-4: Antikörper - Grundgerüst und Klassen.**

Bei Antikörpern können fünf Antikörperklassen (IgG, IgM, IgA, IgD und IgE) unterschieden werden. Alle Antikörper besitzen dasselbe Y-förmige Grundgerüst, welches aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten besteht. Der Typ der schweren Ketten bestimmt die Antikörperklasse. Bei beiden Ketten gibt es eine variable und eine konstante Region. Die variable Region variiert zwischen den verschiedenen Antikörpern in ihrer Aminosäuresequenz und bestimmt somit die Spezifität des Antikörpers. Die konstante Region dagegen ist innerhalb einer Antikörperklasse stark konserviert. Die schweren Ketten der konstanten Region dienen zur Interaktion mit anderen Immunzellen und werden auch als Fc-Fragment bezeichnet. Es kann durch einen Pepsin-Verdau vom F(ab)<sub>2</sub>-Fragment abgespalten werden. Das F(ab)<sub>2</sub>-Fragment umfasst beide Antigen-Bindestellen und kann bei einem Papain-Verdau in zwei Fab-Fragmente gespalten werden. Antikörper der Klassen G, D und E kommen als Monomere vor. Antikörper der Klasse M dagegen besitzen eine Pentamer-Struktur. Die einzelnen Y-Monomere sind durch ein so genanntes joining-Peptid und Disulfidbrücken miteinander verbunden. Bei Antikörpern der Klasse A wird zwischen Antikörpern im Blut (Monomer) und sekretorischen Antikörpern (Dimer) unterschieden. [mit Genehmigung entnommen aus Mulisch (2014)<sup>41</sup>]

Bei einer Borrelien-Infektion sind vor allem Antikörper der Klassen G und M von Bedeutung. IgG-Antikörper liegen als Monomere vor und machen etwa 75 % der gesamten Antikörperpopulation aus<sup>40,42</sup>. IgM-Antikörper dagegen kommen im Blut als Pentamere mit

zehn Antigen-Bindungsstellen vor<sup>39,42</sup>. Sie besitzen meist eine geringere Affinität gegenüber dem Antigen als IgG-Antikörper, gleichen diese jedoch durch eine hohe Avidität auf Grund der vielen Bindungsstellen aus<sup>39</sup>. Abbildung 1-5 gibt einen Überblick über den Verlauf beider Antikörperantworten. Zunächst werden Antikörper der Klasse M gebildet, welche einen ersten Schutz vermitteln sollen<sup>39,42</sup>. Der höchste IgM-Titer ist nach 3-6 Wochen zu erwarten<sup>43</sup>. IgG-Antikörper dagegen werden meist später gebildet und sollten 4-6 Wochen nach einer Infektion nachweisbar sein<sup>15</sup>. Sie sind für die Beseitigung einer Infektion entscheidend<sup>39</sup>. Die Antikörperklassen IgA, IgD und IgE spielen bei einer Borrelien-Infektion nur eine untergeordnete Rolle. So kommen IgA-Antikörper hauptsächlich in Schleimhautsekreten vor und sind dort für die Abwehr von Erregern zuständig<sup>40</sup>. IgD-Antikörper dagegen sind hauptsächlich am Aufbau des B-Zellrezeptors beteiligt und werden in freier Form schnell abgebaut<sup>40</sup>. IgE-Antikörper sind ebenfalls nur in einer geringen Konzentration frei vorhanden. Sie sind meist fest an Rezeptoren auf Mastzellen und Granulozyten gebunden und lösen vor allem bei Allergien oder Parasiten eine Immunantwort aus<sup>40</sup>.



**Abbildung 1-5: Verlauf der IgG/IgM-Antwort bei einer Borrelien-Infektion.**

Kommt es nach einem Zeckenbiss zu einer Borrelien-Infektion, werden zunächst Antikörper der Klasse M gebildet, welche nach 4-6 Monaten wieder verschwinden. Antikörper der Klasse G werden etwa 3 Wochen nach einer Infektion gebildet. Ein Nachweis ist auch noch nach Jahren möglich. [erstellt nach Olesen et al. (2006)<sup>44</sup>]

Die Produktion der spezifischen Antikörper erfolgt durch die Aktivierung naiver B-Zellen<sup>39</sup>. Hierfür benötigen die B-Zellen zwei Signale. Das erste Signal kommt vom B-Zellrezeptor an der Oberfläche der B-Zellen. Dieser löst nach dem Kontakt mit einem Antigen eine Signalkaskade aus und sorgt dafür, dass das Antigen in die Zelle aufgenommen wird. Dort wird es prozessiert und anschließend über MHC-Klasse-II-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert<sup>39</sup>. Das zweite benötigte Signal liefern die T-Helferzellen. Bindet eine spezifische T-Helferzelle an das präsentierte Antigen, exprimiert sie bestimmte Oberflächenproteine und Cytokine, die eine Proliferation und Differenzierung der B-Zellen anregen<sup>39</sup>. Bei extrazellulären Bakterien, wie den Borrelien, kann das zweite Signal auch von TLRs stammen, die durch die Bindung von PAMPs ebenfalls Signalwege zur Proliferation und Differenzierung aktivieren<sup>39</sup>. Nach der Aktivierung differenziert ein Teil der B-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen. Diese

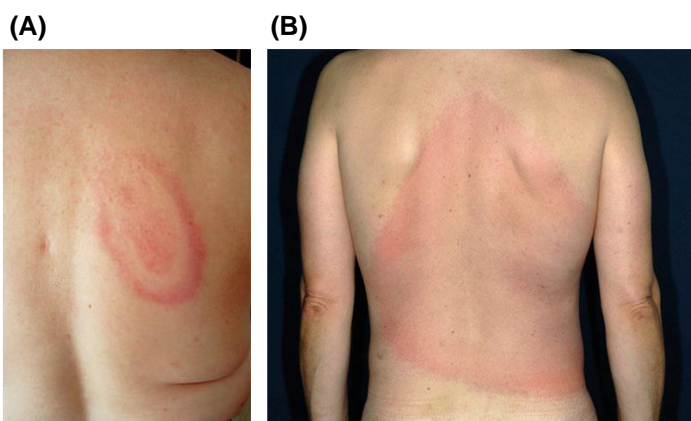
gehören zur primären Immunantwort und produzieren hauptsächlich Antikörper der Klasse M<sup>40</sup>. Der andere Teil der B-Zellen bildet in den Lymphknoten ein so genanntes Keimzentrum. Dort proliferieren die Zellen weiter und differenzieren zu langlebigen Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen<sup>39</sup>. Die langlebigen Plasmazellen gehören zur sekundären Immunantwort. Sie produzieren nach einer somatischen Rekombination Antikörper der Klasse G, A oder E<sup>39</sup>. B-Gedächtniszellen dagegen produzieren keine Antikörper<sup>39</sup>. Sie dienen als Informationsspeicher und werden nach erneutem Kontakt mit dem Antigen aktiviert, so dass die Immunantwort schneller als bei der ersten Infektion erfolgt<sup>45</sup>.

### 1.1.5 klinische Manifestationen

Bei der Lyme-Borreliose handelt es sich um eine Multiorganerkrankung<sup>1</sup> mit anfangs Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Müdigkeit<sup>3</sup>. Die Zeit von der Infektion bis zum Auftreten erster Symptome ist unterschiedlich und kann Tage bis Jahre dauern<sup>3</sup>. Generell sind dermatologische, neurologische, kardiale und muskuloskeletale Beschwerden möglich<sup>20,35</sup>. Es wird zwischen drei Krankheitsstadien unterschieden, wobei die Unterteilung nicht strikt ist<sup>1</sup>.

#### Stadium 1: lokale Infektion

Eine lokale Infektion ist vor allem an einem für die Lyme-Borreliose charakteristischen Hautausschlag erkennbar. Das so genannte Erythema migrans (EM) ist die häufigste klinische Manifestation und erscheint in der Regel nach einer Inkubationszeit von wenigen Tagen bis Wochen<sup>3,6,35</sup>. Es ist dabei entweder ringförmig mit zentraler Rötung (Abbildung 1-6 (A), annulärer Typ) oder über den gesamten Verlauf gleichmäßig gerötet (Abbildung 1-6 (B), makulöser Typ)<sup>1</sup>. Auch kann es solitär oder multilokulär auftreten<sup>1</sup>.



**Abbildung 1-6: Erythema migrans.**

Das Erythema migrans (EM) ist die häufigste klinische Manifestation der frühen Lyme-Borreliose. Es ist entweder vom annulären (A) oder makulösen (B) Typ. Beim annulären Typ erscheint das EM ringförmig mit zentraler Rötung. Beim makulösen Typ ist es über den gesamten Verlauf gleichmäßig gerötet. [(A) mit Genehmigung entnommen aus Stanek & Strle (2018)<sup>6</sup>, (B) mit Genehmigung entnommen aus Müllegger (2018)<sup>1</sup>]

### Stadium 2: disseminierte Infektion

Breiten sich die Borrelien nach der Infektion weiter im Körper aus, kommt es zu einer disseminierten Infektion. Neben der Haut können hier auch die Gelenke und Muskeln sowie das zentrale und periphere Nervensystem betroffen sein<sup>3</sup>. Eine typische Hautmanifestation in diesem Stadium ist das Borrelien-Lymphozytom (Abbildung 1-7). Es handelt sich dabei um eine B-Zell-Pseudolymphom, welches als Reaktion des Körpers auf Borrelien in der Haut entsteht<sup>1</sup>. Sind die Gelenke betroffen, spricht man von einer Lyme-Arthritis<sup>1,35</sup>. Typisch sind von Gelenk zu Gelenk springende Arthridien, wobei vor allem die Kniegelenke betroffen sind<sup>1</sup>. Entwickelt sich eine Neuroborreliose, wird häufig das Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom diagnostiziert. Die Patienten haben anhaltenden polyradikuläre Schmerzen, die vor allem nachts unerträglich werden<sup>2,3,46</sup>. Bei Kindern kommt es oft zu einer einseitigen Lähmung der Gesichtsmuskulatur (Fazialisparese)<sup>3</sup>.



**Abbildung 1-7: Borrelien-Lymphozytom.**

Das Borrelien-Lymphozytom ist ein B-Zell-Pseudolymphom (gutartige Lymphknotenveränderung), welche als Reaktion des Körpers auf Borrelien in der Haut entsteht. Es tritt bei einer disseminierten Infektion mit Hautmanifestationen auf. [mit Genehmigung entnommen aus Müllegger (2018)<sup>1</sup>]

### Stadium 3: persistierende Infektion

Bei einer fehlenden oder nicht ausreichenden Behandlung können sich schwere und chronische Manifestationen entwickeln<sup>1</sup>. Ist die Haut betroffen, entwickelt sich in diesem Stadium an den Extremitäten meist eine Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA, Abbildung 1-8)<sup>1</sup>. Zunächst zeigt sie sich durch eine asymptotische Schwellung und eine livide Verfärbung der betroffenen Hautstelle<sup>2</sup>. Bei fortschreitender Erkrankung kommt es zu einem Schwund des Subkutangewebes, wodurch die Hautvenen sichtbar werden<sup>2</sup>. Oft entwickelt sich im Zusammenhang mit einer ACA auch eine Polyneuropathie<sup>46</sup>. Bei dieser liegt eine Störung von Nerven des peripheren Nervensystems vor. Die Folge ist eine Beeinträchtigung der Sensorik und Motorik<sup>47</sup>.



**Abbildung 1-8: Acrodermatitis chronica atrophicans.**

Die Acrodermatitis chronica atrophicans ist ein Zeichen für eine persistierende Infektion. Sie tritt an den Extremitäten auf und ist durch eine asymptotische Schwellung und eine livide Verfärbung der Haut erkennbar. Ohne Behandlung kommt es zu einem Schwund des Subkutangewebes, wodurch die Hautvenen sichtbar werden. [mit Genehmigung entnommen aus Hunfeld (2020)<sup>3</sup>]

### 1.1.6 Diagnostik

Die Diagnose der Lyme-Borreliose erfolgt hauptsächlich über das klinische Bild<sup>2,6,48</sup>. So ist ein EM ein eindeutiges Zeichen für eine Infektion und auch das Auftreten eines Lymphozytoms, einer ACA oder des Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndroms deuten auf eine Infektion hin<sup>2</sup>.

Auf Grund der jedoch meist eher unspezifischen Natur vieler Manifestationen sollte das klinische Bild bei allen Manifestationen außer dem EM durch eine serologische Diagnostik unterstützt werden<sup>49</sup>. Es wird zwischen einer direkten und indirekten Diagnostik unterschieden. Bei einer direkten Diagnostik wird der Erreger direkt über die Kultivierung oder eine PCR (polymerase chain reaction) nachgewiesen<sup>20</sup>. Beide Methoden werden jedoch auf Grund einer geringen Sensitivität nicht in Guidelines zur Diagnostik einer Lyme-Borreliose empfohlen und somit auch nicht in Routinelaboren eingesetzt<sup>50</sup>. Lediglich in Ausnahmefällen kann eine PCR sinnvoll erscheinen, wobei sie nur bei Hautbiopsien oder der Untersuchung von Gelenksflüssigkeit ausreichend sensitiv ist<sup>48</sup>. Serumproben sind für die PCR ungeeignet, da hier die Erregerzahl häufig zu gering ist<sup>49</sup>. Auch bei einer Kultivierung ist Serum ungeeignet<sup>49</sup>. Darüber hinaus ist die Kultivierung von Borrelien sehr Zeit-intensiv und benötigt ein komplexes Medium<sup>6,35,48</sup>. Ein mikroskopischer Nachweis gilt als ungeeignet und wird derzeit nicht in Leitlinien zur Diagnostik empfohlen<sup>50</sup>.

Bei einer indirekten Diagnostik erfolgt der Nachweis in der Regel über Borrelien-spezifische Antikörper der Klassen G und M im Serum oder CSF (cerebrospinal fluid, Liquor) des Patienten<sup>35</sup>. Für den Nachweis stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wobei meistens eine Kombination aus einem Immunoassay und einem Immunoblot verwendet wird<sup>48</sup> (siehe 1.2.3 Immunoassays in der Lyme-Diagnostik). Eine weitere Möglichkeit der indirekten Diagnostik bietet der Lymphozytentransformationstest (LTT). Bei diesem erfolgt der Nachweis über Borrelien-spezifische T-Lymphozyten im Blut des Patienten und somit über die zelluläre

Immunantwort<sup>51</sup>. Der LTT ist jedoch sehr aufwendig und wird auf Grund einer zu geringen Spezifität nicht für die Diagnostik empfohlen<sup>48,51</sup>.

Bei einer Neuroborreliose erfolgt der Nachweis über eine intrathekale Antikörper-Synthese sowie entzündliche Liquorveränderungen<sup>52</sup>. Eine intrathekale Antikörper-Synthese wird über die Berechnung eines spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex bestimmt<sup>52</sup>. Dafür müssen Antikörper im CSF und Serum eines Patienten nachgewiesen werden, wobei beide Proben vom selben Tag stammen müssen<sup>53</sup>. Für eine Neuroborreliose typische Liquorveränderungen sind unter anderem eine Pleozytose (erhöhte Zellzahl im CSF) und eine Blut-Liquor-Schrankenstörung<sup>52</sup>. Darüber hinaus ist seit einigen Jahren das Chemokin CXCL13 (B lymphocyte chemoattractant, BLC<sup>54</sup>) als Biomarker für eine akute Neuroborreliose bekannt<sup>52</sup>. Es wird in dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert<sup>55</sup> und gilt als Hauptregulator der B-Zell-Rekrutierung bei einer akuten Neuroborreliose<sup>56</sup>. Generell handelt es sich bei Chemokinen um chemotaktische Cytokine mit einem niedrigen Molekulargewicht und einer charakteristischen Tertiärstruktur, die durch Disulfidbrücken stabilisiert wird<sup>57</sup>. CXCL13 gehört zur Familie der  $\alpha$ -Chemokine. Hier sind die zwei N-terminalen Cysteine durch eine Aminosäure voneinander getrennt (CXC). Das in der Bezeichnung enthaltene „L“ steht für das Wort Ligand. Die Zahl beschreibt das kodierende Gen<sup>57</sup>.

### 1.1.7 Therapie

Eine Lyme-Borreliose kann mit einer Antibiotika-Therapie behandelt werden. Je früher mit der Behandlung begonnen wird, umso höher sind die Chancen für eine erfolgreiche Therapie mit vollständiger Heilung<sup>35</sup>. Die Wahl des Antibiotikums hängt unter anderem von der klinischen Manifestation und dem Krankheitsstadium ab<sup>35</sup>. Bei einer lokalen oder frühen disseminierten Infektion wird bevorzugt Doxycyclin, Amoxicillin und Cefuroxim (Cephalosporin der 2. Generation<sup>58</sup>) verabreicht. Die Behandlungsdauer beträgt in der Regel 2-3 Wochen<sup>3</sup>. Persistierende Infektionen werden über 3-4 Wochen mit Amoxicillin oder Cephalosporinen der 3. Generation (z.B. Cefotaxim oder Ceftriaxon<sup>58</sup>) behandelt<sup>3</sup>. Auch bei einer Neuroborreliose werden Cephalosporine der 3. Generation eingesetzt<sup>3</sup>. Bei allen Antibiotika handelt es sich um Breitbandantibiotika, die gegen eine Vielzahl von Erregern wirken<sup>58</sup>. Doxycyclin ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracykline. Es wird oral verabreicht und hat eine bakteriostatische (wachstumshemmende) Wirkung<sup>58</sup>. Auch das Amoxicillin, ein Antibiotikum aus der Klasse der Aminopenicilline, wird oral verabreicht. Es hat eine bakterizide (abtötende) Wirkung und zählt zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika<sup>58</sup>. Diese zeichnen sich durch einen  $\beta$ -Lactam-Ring aus und hemmen bakterielle Enzyme der Zellwandsynthese. Dadurch kommt es zur Bakteriolyse, da die Zellwand dem osmotischen Druck nicht mehr Stand halten kann<sup>59</sup>. Die

Antibiotika Cefuroxim, Cefotaxim und Ceftriaxon gehören ebenfalls zu den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Cefuroxim wird oral verabreicht. Die Antibiotika Cefotaxim und Ceftriaxon dagegen werden parenteral über eine Injektion oder Infusion verabreicht<sup>58</sup>.

Bei einer erfolgreichen Antibiotika-Therapie verschwinden die klinischen Manifestationen und Symptome einer Lyme-Borreliose im Normalfall vollständig. Sind Symptome wie z.B. anhaltende Müdigkeit, Muskelschmerzen oder Konzentrationsschwäche auch noch 6 Monate nach Beendigung der Therapie vorhanden, wird von einem „Post-Lyme-Syndrom“ (post-treatment Lyme disease symptoms, PTLDS) gesprochen<sup>60,61</sup>. Es tritt bei etwa 10 % aller Borreliose-Patienten auf<sup>61</sup>.

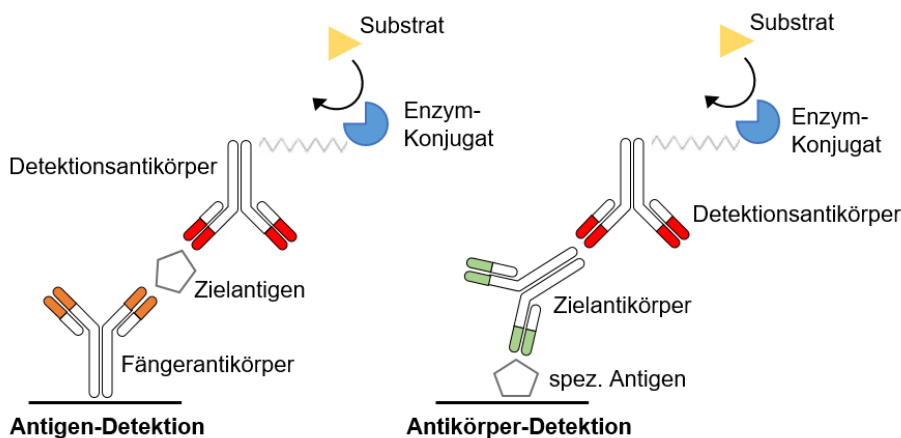
Ein Impfstoff gegen Borrelien ist momentan nicht zugelassen<sup>3</sup>. Ein im Jahr 1998 in den USA durch die FDA (U.S. Food and Drug Administration) zugelassener Impfstoff wurde bereits 2002 wieder vom Markt genommen, da es Berichte über unerwünschte Impfreaktionen gab<sup>35</sup>. Diese konnten jedoch bis heute nicht bestätigt werden<sup>62</sup>. Der monovalente Impfstoff enthielt rekombinantes OspA und schützte, wie mehrere klinische Studien belegten, vor einer Infektion mit der Art *B. burgdorferi* s.s.<sup>62</sup>. In Europa konnte der Impfstoff nicht eingesetzt werden, da kein Schutz gegen die dort häufiger vorkommenden Arten *B. garinii* und *B. afzelii* bestand<sup>35</sup>. Auch heute noch konzentriert sich die Industrie auf die Entwicklung eines geeigneten OspA-Impfstoffs. So befinden sich mittlerweile einige multivalente Impfstoffe mit verschiedenen OspA-Serotypen in klinischen Studien der Phase I,II oder III<sup>63,64</sup>. Die Impfstoffe sollen eine Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Menschen verhindern, indem vom Immunsystem gebildete OspA-Antikörper mit der ersten Blutaufnahme in den Zeckendarm gelangen und dort die Borrelien noch vor der Übertragung neutralisieren<sup>65,66</sup>.

## 1.2 Immunoassays

Immunoassays sind biochemische Tests zur (quantitativen) Detektion von Molekülen über eine Antigen-Antikörper-Reaktion<sup>67</sup>. Sie werden vielfach in der Forschung und Diagnostik eingesetzt<sup>68</sup>. Meistens wird ein Antigen, welches z.B. als Biomarker bekannt ist, in einem so genannten Sandwich-Assay über die Bindung an einen Primärantikörper (Fängerantikörper) und einen Sekundärantikörper (Detektionsantikörper) nachgewiesen<sup>69</sup>. Andersrum ist auch der Nachweis von Antikörpern möglich. Dabei wird statt dem Fängerantikörper ein spezifisches Antigen verwendet<sup>69</sup>. In Abbildung 1-9 sind beide Möglichkeiten am Beispiel eines klassischen ELISAs graphisch dargestellt. Sowohl bei der Antigen- als auch bei der Antikörperdetektion kann entweder ein planares oder ein Mikrosphären-basiertes System verwendet werden<sup>69,70</sup>. Bei einem planaren System, wie z.B. dem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), ist der Fängerantikörper bzw. das Antigen an eine feste Oberfläche gebunden. Bei einem



Mikrosphären-basierten System dagegen wird der Fängerantikörper oder das Antigen an ungebundene paramagnetische Mikrosphären immobilisiert<sup>69,70</sup>.



**Abbildung 1-9: Sandwich-Assay zur Detektion eines Antigens bzw. Antikörpers.**

Mit einem Sandwich-Assay ist es möglich sowohl Antigene als auch Antikörper in biologischen Proben nachzuweisen. Bei einem klassischen ELISA erfolgt die Antigendetektion über die Bindung an einen so genannten Fängerantikörper und einen Detektionsantikörper. Der Detektionsantikörper ist dabei an ein Enzym gekoppelt, welches die Umwandlung eines farblosen Substrats in ein dunkel gefärbtes Derivat katalysiert. Bei einer Antikörper-Detektion dagegen wird statt einem Fängerantikörper ein spezifisches Antigen verwendet. Die Detektion erfolgt auch hier über einen Enzym-konjugierten Detektionsantikörper.

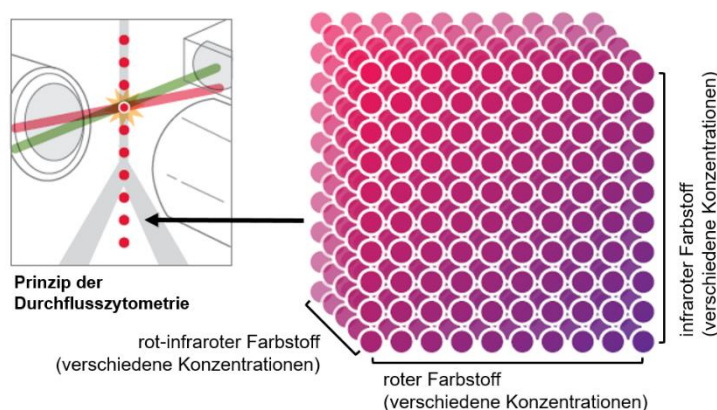
### 1.2.1 multiplexe Immunoassays

Eine besondere Form des Immunoassays ist der Mikrosphären-basierte multiplexe Immunoassay. Mit diesem ist es möglich eine große Anzahl an Proteinen (Analyten) gleichzeitig in nur einem Ansatz nachzuweisen<sup>70</sup>.

Die xMap-Technologie der Luminex Corporation (Austin, TX, USA) bietet die Möglichkeit bis zu 500 Analyten zu detektieren. Das Prinzip der Technologie beruht auf der Methode der Durchflusszytometrie, wobei statt Zellen verschiedene Mikrosphären unterschieden werden<sup>71</sup>. Die Mikrosphären (auch Beads genannt) sind paramagnetisch und haben einen Durchmesser von 6,5  $\mu\text{m}$ . In ihrem Inneren befindet sich eine spezifische Mischung aus drei Fluoreszenzfarbstoffen, so dass ein Signal eindeutig einer Mikrosphären-ID und somit einem daran immobilisierten Antigen/Antikörper zugeordnet werden kann. Die äußere Schicht besteht aus Carboxylgruppen und ist bei allen Mikrosphären gleich<sup>72</sup>. Ein Einsatz der xMAP-Technologie ist auf verschiedenen Luminex-Plattformen möglich. In der Abbildung 1-10 wird die Technologie am Beispiel der FLEXMAP 3D Plattform, die mit zwei Lasern ausgestattet ist, erklärt. Der erste Laser bei 638 nm (Classification Channel)<sup>73</sup> dient zur Unterscheidung der fluoreszierenden Mikrosphären. Der zweite Laser bei 532 nm (Reporter Channel)<sup>73</sup> ist für den Nachweis eines Phycoerythrin-konjugierten Detektionssystems. Eine weitere Plattform für die xMAP-Technologie ist die INTELLIFLEX Plattform. Sie verfügt über einen zusätzlichen Laser



bei 405 nm (2nd Reporter Channel)<sup>73</sup>. Dieser kann mit einem Detektionssystem verwendet werden, das mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff als Phycoerythrin konjugiert ist.



**Abbildung 1-10: xMAP-Technologie der Luminex Corporation (FLEXMAP 3D Plattform).**

Mit der xMAP-Technologie können bis zu 500 verschiedene Analyten in nur einem Ansatz nachgewiesen werden. Die Technologie basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, wobei keine Zellen, sondern Mikrosphären unterschieden werden. Diese besitzen in ihrem Inneren eine Mischung aus drei Fluoreszenzfarbstoffen. Für die Unterscheidung werden die Mikrosphären mit einem roten Laser bei 638 nm angeregt. Ein grüner Laser mit einer Anregungswellenlänge von 532 nm wird für die Detektion des Analyten verwendet. In der Regel wird ein PE-konjugiertes Detektionssystem eingesetzt. [mit Genehmigung entnommen aus Luminex Corp. Technology Information (2022)<sup>71</sup>, modifiziert]

## 1.2.2 Validierung von Immunoassays

Unter Validierung versteht man die Erbringung eines objektiven Nachweises zur Bestätigung, dass die Anforderungen für einen bestimmten Verwendungszweck erfüllt werden<sup>74,75</sup>.

Bei der Validierung von Immunoassays wird zwischen einer technischen und einer klinischen Validierung unterschieden.

### technische Validierung

Die technische Validierung dient dazu, die Robustheit und Zuverlässigkeit eines Assays zu bestätigen. Hierfür stehen verschiedene Guidelines, wie z.B. die „Guideline on bioanalytical method validation“ der European Medicines Agency (EMA)<sup>76</sup> oder die „Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry“ der U.S. Food and Drug Administration (FDA)<sup>77</sup> zur Verfügung. Basierend auf diesen wurden für diese Arbeit folgende Parameter untersucht.

#### Detektionsgrenze (Limit of Detection, LOD)

Bei der Bestimmung der Detektionsgrenze wird die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der ein Analyt noch sicher nachgewiesen werden kann. Das Signal des Analyten muss sich signifikant vom Hintergrundsignal des Assays unterscheiden.

### untere Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ)

Die untere Bestimmungsgrenze definiert die niedrigste Konzentration, die noch mit ausreichender Präzision bestimmt werden kann. Bei Konzentrationen unterhalb dieser Grenze muss von einer ungenauen Konzentrationsbestimmung ausgegangen werden.

### obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantification = ULOQ)

Die obere Bestimmungsgrenze ist die höchste Konzentration, die noch mit ausreichender Präzision bestimmt werden kann. Bei höheren Konzentrationen muss von einer ungenauen Konzentrationsbestimmung ausgegangen werden.

### Intra-assay Präzision

Bei der Intra-assay Präzision wird die Stabilität der Messung innerhalb einer Assayplatte untersucht. Die Messung der MFI-Signale muss in jedem well einer Platte reproduzierbar sein. Es dürfen keine Schwankungen zwischen den Signalen vorliegen.

### Inter-assay Präzision

Bei der Inter-assay Präzision wird die Stabilität der Messung über verschiedene Assayplatten untersucht. Die Messung der MFI-Signale muss auf verschiedenen Platten reproduzierbar sein. Es dürfen keine Schwankungen zwischen den Signalen vorliegen.

### Spike-in Wiederfindung

Mit der Untersuchung der Spike-in Wiederfindung soll untersucht werden, zu wie viel Prozent ein Analyt in einer komplexen Matrix nachgewiesen werden kann.

### Verdünnungslinearität

Mit der Betrachtung der Verdünnungslinearität wird untersucht, ob es möglich ist eine Probe mit hoher Analyten-Konzentration in den linearen Bereich einer Standardkurve zu verdünnen. Bei Proben mit einer Konzentration außerhalb der Standardkurve muss auch nach der Verdünnung in den Standardkurven-Bereich eine korrekte Quantifizierung möglich sein.

### Parallelität der Probenverdünnung

Die Parallelität der Probenverdünnung wird untersucht, um den Bereich zu ermitteln, in dem das Signal eines Analyten proportional zu dessen Konzentration ist. Bei einer quantitativen Detektion soll zudem festgestellt werden, ob der endogene Analyt die gleichen Bindungseigenschaften wie die Standardkurve hat oder ob so genannte Matrixeffekte, die einen Einfluss auf die Detektion haben, vorliegen.

### Gefrierzyklus-Stabilität

Bei der Gefrierzyklus-Stabilität wird die Stabilität des Analyten in der Probenmatrix untersucht. Es soll festgestellt werden, wie oft eine Probe aufgetaut und wieder eingefroren werden darf, ohne dass dies Auswirkungen auf die Reproduzierbarkeit der MFI-Signale hat.

### Kurzzeit- und Temperaturstabilität

Auch bei der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wird die Stabilität des Analyten in der Probenmatrix untersucht. Es soll festgestellt werden, unter welchen Bedingungen eine Probe gelagert werden kann.

### **klinische Validierung**

Bei der klinischen Validierung werden Grenzwerte zur Unterscheidung zwischen negativen (gesunden) bzw. positiven (erkrankte) Patienten festgelegt und die Genauigkeit des Assays bestimmt. Hierfür werden Proben von Patienten mit einem eindeutigen Serostatus benötigt.

## **1.2.3 Immunoassays in der Lyme-Diagnostik**

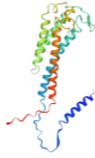
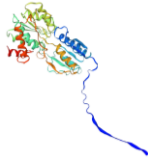
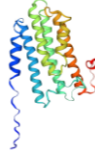
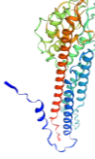
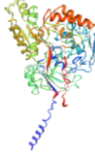
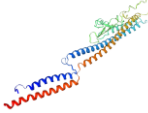
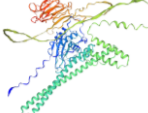
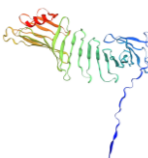
Für den serologischen Nachweis einer Lyme-Borreliose wird in Europa in verschiedenen Guidelines, wie z.B. von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), eine 2-Stufen-Diagnostik bestehend aus einem Immunoassay und einem Immunoblot empfohlen<sup>50</sup>. Der Immunoassay, meist ein ELISA<sup>6</sup>, wird dabei als so genannter Suchtest verwendet und besitzt in der Regel eine höhere Sensitivität als Spezifität<sup>1</sup>. Der Immunoblot wird bei einem positiven oder zweifelhaften Ergebnis im Suchtest als Bestätigungstest eingesetzt. Die Spezifität sollte hier bei nahezu 100 % liegen<sup>1,48</sup>.

Generell unterscheiden sich die auf dem Markt befindlichen ELISAs und Immunoblots zum Teil deutlich in ihrer Sensitivität und Spezifität<sup>78</sup>. Vor allem bei der IgM-Detektion gibt es häufig nur eine geringe Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Immunoblots. Je nach Kombination aus ELISA und Immunoblot kann auch die 2-Stufen-Diagnostik unterschiedliche Ergebnisse liefern<sup>78</sup>. Dies muss bei der Wahl des ELISAs sowie des Immunoblots für die 2-Stufen-Diagnostik berücksichtigt werden und ist zum Teil auf die im jeweiligen Test enthaltenen Antigene zurückzuführen. Dabei kann es sich um Antigene aus Zell-Lysaten oder rekombinante Antigene handeln<sup>78</sup>. Werden rekombinante Antigene eingesetzt, sind es häufig Oberflächenlipoproteine, welche bei der Dissemination der Borrelien im Körper (OspC, BmpA, DbpA)<sup>7,19</sup> oder der Immunevasion (VlsE)<sup>17</sup> eine Rolle spielen. Daneben werden meist auch das Peptid-bindende Protein OppA-2 des Opp-Transportsystems<sup>30</sup> sowie das Flagellin-Protein p41<sup>34</sup> und das Protein p83/100 (BB074), welches vermutlich für einen optimalen Gewebetropismus entscheidend ist<sup>79</sup>, eingesetzt. Zudem wird bei einigen Tests das Antigen OspA verwendet. Dieses spielt vor allem bei der Persistenz der Borrelien im

Zeckendarm eine Rolle<sup>31</sup>, ist jedoch auch bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Infektion nachweisbar<sup>7</sup>. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Antigene. Die Antigene werden von allen Borrelien-Arten exprimiert, können jedoch zwischen den Arten in ihrer Aminosäuresequenz variieren. Es kann zwischen Antigenen der frühen und der späten Infektionsphase sowie der primär ausgelösten Antikörperantwort unterschieden werden.

**Tabelle 1-1: Antigene in der Borreliose-Diagnostik.**

Die Antigene können sowohl anhand der primär ausgelösten Antikörperantwort als auch der Infektionsphase, in der sie eine Antikörperantwort auslösen unterschieden werden. Die gezeigten 3D Strukturen stammen vom Bioinformatik-Webserver „SWISS-MODEL“. Sie basieren auf Sequenzen der UniProt-Datenbank.

Funktion	Antigen	Beschreibung	3D Struktur
Dissemination im Körper	OspC	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 21 - 25 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: früh</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgM</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: hoch</li> <li>⇒ konservierte Region bekannt</li> </ul>	
	BmpA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 39 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: früh / spät</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: gering</li> </ul>	
	DbpA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 17 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: spät</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: sehr hoch</li> </ul>	
Immunevasion	VlsE	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 35 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: früh</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: sehr hoch</li> <li>⇒ konservierte Region bekannt</li> </ul>	
Peptid-Transport	OppA-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 58 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: spät</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: gering</li> </ul>	
Flagella-Aufbau	p41	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 41 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: früh</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgM / IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: gering</li> </ul>	
Gewebetropismus	p83/100	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 83 - 100 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: spät</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: gering</li> </ul>	
Persistenz im Zeckendarm	OspA	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 34 kDa</li> <li>▪ Infektionsphase: spät</li> <li>▪ Antikörperantwort: IgG</li> <li>▪ Sequenz-Heterogenität: hoch</li> </ul>	

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung zweier Multiplextests zum Nachweis der humanen Lyme-Borreliose. Dabei sollte zum einen die Detektion einer Antikörperantwort in der frühen Infektionsphase verbessert und zum anderen eine Differentialdiagnostik zu anderen Erregern mit Borrelien-ähnlicher Symptomatik ermöglicht werden. Die entwickelten Tests sollten der konventionellen 2-Stufen-Diagnostik überlegen sein. Der erste Test sollte für den Einsatz in epidemiologischen Studien, wie z.B. der NAKO Gesundheitsstudie entwickelt werden. Hierbei sollte der Nachweis einer humoralen Immunantwort bei einer Borrelien-Infektion unabhängig von einer tatsächlichen Erkrankung im Vordergrund stehen. Der zweite Test sollte für eine verbesserte Diagnose der frühen Neuroborreliose entwickelt werden.

In beiden Assays sollten zur Verbesserung der Sensitivität Antigene von allen in Europa bekannten humanpathogenen Borrelien-Arten verwendet werden.

Bei dem für epidemiologische Studien entwickelten Assay sollte zudem durch Etablierung der neuen INTELLIFLEX Plattform eine gleichzeitige Detektion von IgG- und IgM-Antikörpern möglich sein. Dies sollte den Verbrauch von Probenmaterial verringern, die Materialkosten senken und einen zeitlichen Mehraufwand durch den separaten Nachweis beider Antikörperklassen verhindern. Zudem sollte der Assay für Messungen im Hochdurchsatz automatisiert werden. Um die Genauigkeit des entwickelten Assays zu bestimmen, sollte dieser mit einem ebenfalls Bead-basierten kommerziellen multiplexen Borreliose-Test sowie einer standardmäßig verwendeten 2-Stufen-Diagnostik bestehend aus einem ELISA und einem Immunoblot verglichen werden. Die Anwendbarkeit des Assays sollte durch die Messung einer Querschnittskohorte aus der MuSPAD-Studie, einer nationalen Studie zur Untersuchung der SARS-CoV-2 Seroprävalenz in Deutschland, demonstriert werden.

Mit dem entwickelten Assay zur Verbesserung der Diagnostik einer Neuroborreliose sollte es am Ende möglich sein IgG- bzw. IgM-Antikörper gleichzeitig mit dem CXCL13 im CSF nachzuweisen. Zudem sollte eine Berechnung des Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex durch eine zusätzliche Detektion von Antikörpern im Serum ermöglicht werden. Des Weiteren sollten in den Assay Antigene des Syphilis-Erregers *Treponema pallidum ssp. pallidum* für eine Differentialdiagnostik integriert werden. Durch eine Infektion mit dem Erreger kann es zu einer Neurosyphilis kommen, welche in ihrer Symptomatik einer Neuroborreliose ähnlich ist und ebenfalls mit einer erhöhten CXCL13-Konzentration in Verbindung gebracht wird. Um die Funktionalität des entwickelten Assays zu bestätigen, sollten am Ende CSF/Serum-Paare von Patienten mit einer Neuroborreliose im Vergleich zu CSF/Serum-Paaren einer negativen Kontrollgruppe analysiert werden. Zudem sollte anhand von Verlaufsproben ein möglicher Einsatz des CXCL13 bei der Kontrolle des Therapieverlaufs untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antigene / Peptide

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 3-1 (*Borrelia*) und Tabelle 3-2 (*Treponema*) aufgeführten rekombinanten Antigene verwendet. Alle Antigene wurden von der tgcBIOMICS GmbH (Bingen, DE) im Rahmen eines gemeinsamen ZIM-Projekts des BMWi (FKZ: ZF4585502AJ8) hergestellt. Die Lagerung der Antigene erfolgte nach Absprache mit der tgcBIOMICS GmbH bei 4 °C. Zudem wurden die in der Tabelle 3-3 aufgeführten Peptide verwendet. Die Peptide wurden von der Firma Intavis (Tübingen, DE) im Auftrag des NMI synthetisiert und bei -20 °C gelagert. Es wurden zwei Peptide (VlsE und OspC) mit jeweils zwei unterschiedlichen Linkern (Cys-Doa-Doa und Biotin-Ttds) bestellt. Der Linker wird für eine Immobilisierung der Peptide an MagPlex Mikrosphären (siehe 3.2.4 Immobilisierung von Peptiden an MagPlex Mikrosphären) benötigt. Weiter wurde ein rekombinant in *E. coli* exprimiertes humanes CXCL13 (Val23-Arg94) von der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) eingesetzt, welches ebenfalls bei -20 °C gelagert wurde.

**Tabelle 3-1: *Borrelia*-Antigene.**

Antigen	Art	Stamm	Bezeichnung
BmpA ( <b>B</b> asic <b>m</b> embrane <b>p</b> rotein <b>A</b> )	<i>B. afzelii</i>	PKo	BmpA - PKo
DbpA ( <b>D</b> ecorin <b>b</b> inding <b>p</b> rotein <b>A</b> )	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	ZS7	DbpA - ZS7
	<i>B. garinii</i>	20047	DbpA - 20047
	<i>B. afzelii</i>	PKo	DbpA - PKo
	<i>B. spielmanii</i>	A14S	DbpA - A14S
	<i>B. bavariensis</i>	PBi	DbpA - PBi
OppA-2 ( <b>O</b> ligopeptide <b>p</b> ermease <b>p</b> rotein <b>A</b> -2)	<i>B. bavariensis</i>	PBi	OppA-2 - PBi
OspA ( <b>O</b> uter <b>s</b> urface <b>p</b> rotein <b>A</b> )	<i>B. afzelii</i>	PKo	OspA - PKo
OspC ( <b>O</b> uter <b>s</b> urface <b>p</b> rotein <b>C</b> )	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	B31	OspC - B31
	<i>B. garinii</i>	20047	OspC - 20047
	<i>B. afzelii</i>	PKo	OspC - PKo
	<i>B. spielmanii</i>	A14S	OspC - A14S
	<i>B. bavariensis</i>	PBi	OspC - PBi
p41i (internes Fragment von <b>p41</b> )	<i>B. afzelii</i>	PKo	p41i - PKo
p83/100	<i>B. afzelii</i>	PKo	p83/100 - PKo
VlsE ( <b>V</b> ariable membrane protein like sequence <b>E</b> xpressed)	<i>B. burgdorferi</i> s.s	B31	VlsE - PKo

**Tabelle 3-2: *Treponema*-Antigene.**

Antigen	Art
TmpA ( <b>T</b> reponema <b>m</b> embrane <b>p</b> rotein <b>A</b> )	<i>Treponema pallidum</i> ssp. <i>pallidum</i>
Tpp15 ( <b>T</b> reponema <b>p</b> allidum <b>p</b> rotein <b>15</b> kDa)	
Tpp17 ( <b>T</b> reponema <b>p</b> allidum <b>p</b> rotein <b>17</b> kDa)	
Tpp47 ( <b>T</b> reponema <b>p</b> allidum <b>p</b> rotein <b>47</b> kDa)	

**Tabelle 3-3: Peptide.**

Peptid	AS-Sequenz	MW (g/mol)
Biotin-Ttds-VIsE	Biotin--Ttds-MKKDDQIAAAIALRGMMAKDDKFAVK-NH2	3.205
Cys-Doa-Doa-VIsE	H-C-Doa--Doa-MKKDDQIAAAIALRGMMAKDGKFAVK-NH2	3.070
Biotin-Ttds-OspC	Biotin--Ttds-PVVAESPCKP-OH	1.580
Cys-Doa-Doa-OspC	H-C-Doa--Doa-PVVAESPCKP-OH	1.445

### 3.1.2 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper sind in der Tabelle 3-4 (unkonjugierte Antikörper) und Tabelle 3-5 (konjugierte Antikörper) aufgelistet. Zusätzlich wurde IgG und IgM aus Humanserum von der Firma Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen.

**Tabelle 3-4: unkonjugierte Antikörper.**

Antikörper	Spezifität	Spezies	Hersteller
gt-a-hulgG (polyklonal)	hu IgG (Fc <sub>γ</sub> )	gt (IgG gesamt)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
dk-a-hulgM (polyklonal)	hu IgM (Fc <sub>5μ</sub> )	dk (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
gt-a-ms (polyklonal)	ms IgG (H+L)	gt (IgG gesamt)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
rb-a-gt (polyklonal)	gt IgG (F(ab') <sub>2</sub> )	rb (IgG gesamt)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
dk-a-rb (polyklonal)	rb IgG (H+L)	dk (IgG gesamt)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
ms-a-huCXCL13 (monoklonal)	hu CXCL13	ms	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
gt-a-huCXCL13 (polyklonal)	hu CXCL13	gt	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
rb-a-huCXCL13 (polyklonal)	hu CXCL13	rb	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA

**Tabelle 3-5: konjugierte Antikörper.**

Antikörper	Spezifität	Spezies	Konjugat	Hersteller
gt-a-hulgG-PE (polyklonal)	hu IgG (FC <sub>γ</sub> )	gt (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	RPE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
dk-a-hulgM-PE (polyklonal)	hu IgM (FC <sub>5μ</sub> )	dk (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	RPE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
gt-a-ms-PE (polyklonal)	ms IgG (H+L)	gt (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	RPE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
dk-a-gt-PE (polyklonal)	gt IgG (H+L)	dk (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	RPE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
dk-a-rb-PE (polyklonal)	rb IgG (H+L)	dk (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	RPE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
gt-a-hulgG-BV421 (polyklonal)	hu IgG (FC <sub>γ</sub> )	gt (IgG gesamt)	BV421	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
gt-a-hulgG-Biotin (polyklonal)	hu IgG (FC <sub>γ</sub> )	gt (IgG F(ab') <sub>2</sub> )	Biotin	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

### 3.1.3 Proben

#### Central BioHub

Von Central BioHub (Hennigsdorf, DE) wurden fünf verschiedene Probensets verwendet (Tabelle 3-6). Die Sets wurden von März 2019 bis Mai 2021 erworben.

**Tabelle 3-6: Central BioHub Probensets.**

Probenmatrix	Beschreibung	Anzahl der Proben
Serum	gesund (nach eigener Angabe)	50
Serum	Lyme-Borreliose	13
Serum	Syphilis	19
CSF	Lyme-Borreliose	8

Die Serum- und CSF-Proben zur Lyme-Borreliose und Syphilis waren mit mindestens einem der nachfolgenden Tests vorgetestet.

Lyme Borreliose:

- LIAISON Borrelia IgG / IgM (DiaSorin, Saluggia, IT)
- Anti-Borrelia-plus-VlsE-ELISA IgG / Anti-Borrelia-ELISA IgM (Euroimmun, Lübeck, DE)
- Anti-Borrelia-EURLINE-RN-AT IgG / IgM (Euroimmun, Lübeck, DE)
- Borrelia ViraStripe IgG / IgM (Viramed Biotech, Planegg, DE)
- SERION ELISA classic Borrelia burgdorferi IgG / IgM (Virion/Serion, Würzburg, DE)
- Borrelia afzelii + VlsE IgG ELIS / IgM ELISA (VIROTECH Diagnostics, Dietzenbach, DE)

Syphilis:

- Anti-Treponema pallidum EUROLINE-WB IgG / IgM (Euroimmun, Lübeck, DE)
- Atellica IM Syphilis (Siemens Healthcare, Erlangen, DE)
- RecombiBest antipallidum-total antibodies Set 2 / IgM (Vector-Best, Novosibirsk, RU)

#### Klinik für Neurologie, Sächsisches Krankenhaus Rodewisch

Die Klinik für Neurologie des Sächsischen Krankenhaus Rodewisch (Rodewisch, DE) stellte für diese Arbeit 18 CSF/Serum-Paare zu Verfügung. Die Übermittlung der dazugehörigen Metadaten erfolgte vollständig anonymisiert. Einige Probenpaare stellten Verlaufspalten dar. Die Proben wurden im Labor der Klinik mit dem Anti-Borrelia-plus-VlsE-ELISA IgG und dem Anti-Borrelia-ELISA IgM der Firma Euroimmun (Lübeck, DE) untersucht.

#### Biobank des DZNE & Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung

Es wurden 115 CSF-Proben aus der Biobank des DZNE & des Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung verwendet. Zu den Proben gab es keine Borreliose-Diagnostik. Sie wurden daher als negative Proben verwendet.



### **Neurobiobank - Universitätsklinikum Ulm**

Von der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm wurden 10 CSF/Serum-Paare von Patienten mit einer Neuroborreliose und 9 CSF/Serum-Paare als Negativkontrolle anonymisiert zur Verfügung gestellt.

### **MEMO (Memory and Morbidity in Augsburg Elderly)**

Es wurden 365 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie verwendet. Es handelt sich um eine Studie aus dem Jahr 1997/98. Die Studie wurde als Folgeprojekt der WHO MONICA Studie S2, Deutschland aus dem Jahr 1989/90 geführt. Ziel der Studie war ursprünglich die Untersuchung kognitiver Funktionen und kardiovaskulärer Risikofaktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen in der älteren Bevölkerung. Dafür wurden Personen ausgewählt die zum Zeitpunkt der Studie 65 Jahre oder älter waren und im Raum Augsburg lebten<sup>80</sup>. Darüber hinaus wurden die Proben der MEMO-Studie für eine Untersuchung über die Auswirkung einer Seropositivität gegenüber mit chronischen Infektionen assoziierten Pathogenen auf die Sterblichkeit bei Älteren verwendet. Bei dieser Untersuchung wurden die Proben auch auf eine Borrelien-Infektion getestet<sup>81</sup>. Die Genehmigung der MEMO-Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Münster, Germany erteilt.

### **MuSPAD (Multilokale und Serielle Prävalenzstudie zu Antikörpern gegen SARS-2-Coronavirus in Deutschland)**

Aus der MuSPAD-Studie wurden 1.555 Serumproben auf Borrelien-spezifische IgG/IgM-Antikörper untersucht. Es handelt sich um eine nationale Studie zur Untersuchung der SARS-CoV-2 Seroprävalenz in Deutschland, die von der Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF) finanziert wurde. Die Proben wurden von Juli 2020 bis August 2021 an verschiedenen Standorten in Deutschland (Aachen, Chemnitz, Freiburg, Greifswald, Hannover, Magdeburg, Osnabrück und Reutlingen) gesammelt. Proben vom Standort Hannover wurden in dieser Arbeit nicht verwendet. Alle Studienteilnehmer waren 18 Jahre oder älter<sup>82</sup>. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover, Deutschland (9086\_BO\_S\_2020) genehmigt.

#### **3.1.4 kommerzielle Borreliose-Tests**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in der Tabelle 3-7 aufgeführten kommerziellen Borreliose-Tests verwendet. Untersuchungen mit den Tests der Firma Mikrogen (München, DE) fanden am NMI statt. Analysen mit den Tests der Firma Virotech Diagnostics (Dietzenbach, DE) erfolgten durch das alphaomega Labor (Leipzig, DE). Das Labor besitzt eine Akkreditierung nach DIN EN SIO/IEC 17025:2005 (Akkreditierungsnummer D-PL-18167-01). Eine Übersicht aller Messungen ist im Anhang in der Abbildung 7-1 zu finden.

**Tabelle 3-7: kommerzielle Borreliose-Tests.**

Test	Hersteller
recomBead Borrelia IgG 2.0	Mikrogen, München, DE
recomBead Borrelia IgM 2.0	Mikrogen, München, DE
Borrelia afzelii + VlsE IgG Europe ELISA	Virotech Diagnostics, Dietzenbach, DE
Borrelia afzelii IgM ELISA	Virotech Diagnostics, Dietzenbach, DE
Borrelia Europe plus TpN17 LINE IgG	Virotech Diagnostics, Dietzenbach, DE
Borrelia Europe LINE IgM	Virotech Diagnostics, Dietzenbach, DE

### 3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Alle benötigten Chemikalien und Reagenzien sind der Tabelle 3-8 zu finden.

**Tabelle 3-8: Chemikalien und Reagenzien.**

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
10x PBS	Fisher Scientific, Schwerte, DE
10 % Triton™ X-100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
32 % Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Blocking Reagent for ELISA (BRE)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HAMA-Blocker	Fitzgerald Industries, North Acton, MA, USA
InstantBlue® Coomassie Protein Stain	Abcam, Cambridge, UK
Lightning-Link® R-Phycoerythrin Conjugation Kit	Abcam, Cambridge, UK
LowCross-Buffer® (LCB)	Candor Bioscience, Wangen, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MES	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NuPAGE™ Antioxidant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fisher Scientific, Schwerte, DE
Pferdeserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ProClin™ 300	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RF-Absorbens	Virion\Serion, Würzburg, DE
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
sNHS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Streptavidin (aus <i>Streptomyces avidinii</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Streptavidin-BV421	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Streptavidin-PE (PJ31S)	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Streptavidin-PE (SAPE-001)	Moss Inc., Pasadena, MD, USA
sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
TCEP	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween®20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
xMap® Sheath Concentrate plus	Luminex Corp., Austin, TX, USA

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen sind in der Tabelle 3-9 aufgeführt.

**Tabelle 3-9: Puffer und Lösungen.**

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
4x Laemmli-Puffer	20 % 1 M TRIS – pH 6,8 40 % Glycerol 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol 80 mg/mL SDS 2 mg/mL Bromphenolblau ddH <sub>2</sub> O
10x TBS – pH 7,4	1,5 M NaCl 0,1 M TRIS ddH <sub>2</sub> O
Aktivierungsmix	Aktivierungspuffer – pH 6,2 5 mg/mL EDC 5 mg/mL sNHS
Aktivierungspuffer – pH 6,2	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ddH <sub>2</sub> O 0,005 % Triton X-100 (KingFisher-Immobilisierung)
Assaypuffer Borrelia multiplex	1:4 LCB/CBS 0,05 % Tween20
Assaypuffer Borrelia neuroplex	CBS 0,05% Tween20 150 mM NaCl 2,5% Pferdeserum 1:1000 HAMA-Blocker
CBS	10x PBS ddH <sub>2</sub> O 1,0 % BSA
CBS + 0,05 % Tween20 (CBST)	CBS 0,05 % Tween20
Kopplungspuffer – pH 5,0	50 mM MES ddH <sub>2</sub> O 0,005 % Triton X-100 (KingFisher-Immobilisierung)
Kopplungspuffer für Streptavidin – pH 5,0	100 mM MES ddH <sub>2</sub> O 0,01 % Triton X-100
Lagerungspuffer	CBS 0,05 % ProClin 300
Lagerungspuffer für Streptavidin-Mikrosphären	10x PBS ddH <sub>2</sub> O 0,05 % ProClin 300
PBS	10x PBS ddH <sub>2</sub> O

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS + 0,005 % Triton X-100 – pH 7,4	10x PBS ddH <sub>2</sub> O 0,005 % Triton
PBS + 0,05 % Tween20 – pH 7,4 (PBST)	10x PBS ddH <sub>2</sub> O 0,05 % Tween20
TBS + 0,1 % Tween20 (TBST)	10x TBS ddH <sub>2</sub> O 0,1 % Tween20

### 3.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterial

Es wurden die in der Tabelle 3-10 aufgelisteten Geräte verwendet. Das verwendete Verbrauchsmaterial ist in der Tabelle 3-11 zu finden.

**Tabelle 3-10: Geräte.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage (Explorer-Serie)	Ohaus Europe, Nänikon, CH
DynaMag™-Spin Magnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal, 0,5-20 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal, 2-20 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal, 10-100 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal, 20-200 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 1-Kanal, 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 0,5-10 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 10-100 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 30-300 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Xplorer®, 1-Kanal, 50-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Xplorer®, 1-Kanal, 15-300 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Xplorer®, 8-Kanal, 50-1200 µL	Eppendorf, Hamburg, DE
FluidX Perception™ HD Rack Reader + Linear Barcode Adaptor	Brooks Automation Ltd., Chelmsford, MA, USA
HulaMixer®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KingFisher® 96 / KingFisher® Flex	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LabElite DeCapper SL	Hamilton, Reno, NV, USA
Luminex FLEXMAP 3D® / INTELLIFLEX®	Luminex Corp., Austin, TX, USA
Mikroplatten-Washer 405 TS / MultiFlo™ FX	BioTek, Winooski, VT, USA
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, DE
Plattenmagnet	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettierroboter Biomek i7	Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA
Prometheus NT.48	NanoTemper Technologies, München, DE
Spannungsquelle Power Ease 500	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler (Mastercycler® gradient)	Eppendorf, Hamburg, DE
ThermoMixer® C / Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Typhoon TRIO Variable Mode Imager System	GE Healthcare Life Sciences

Gerät	Hersteller
Ultraschallbad Sonorex Super RK31	Bandelin electronic, Berlin, DE
Vortexschüttler (Vortex-Genie™ 2)	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophorese-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge 5910 R	Eppendorf, Hamburg, DE

**Tabelle 3-11: Verbrauchsmaterial.**

Material	Hersteller
Axygen® Verschlussfolie	Corning, Corning, NY, USA
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Centri-Sep™ Spin Columns	Princeton Separations, Freehold, NJ, USA
Combitips® advanced 1,0 mL	Eppendorf Hamburg, DE
Combitips® advanced 2,5 mL	Eppendorf Hamburg, DE
Combitips® advanced 5,0 mL	Eppendorf Hamburg, DE
Filterspitzen Biosphere® plus 20 µL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Filterspitzen Biosphere® plus 100 µL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Filterspitzen Biosphere® plus 200 µL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Filterspitzen Biosphere® plus 300 µL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Filterspitzen Biosphere® plus 1000 µL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Filterspitzen Axygen® 30 µL	Corning, Corning, NY, USA
Filterspitzen Biomek Tip 180 µL	Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA
Filtropur Flaschenaufsatzfilter 0,2 µm	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Kapillaren (für Prometheus NT.48)	NanoTemper Technologies, München, DE
Kapillarspitzen	VWR International, Radnor, PA, USA
KingFisher® deep-well 96 Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
KingFisher® deep-well 96 Kamm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MagPlex® Mikrosphären	Luminex Corp., Austin, TX, USA
Mikrotiterplatte, 96 well, V-Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Mikrotiterplatte, 96 half-well, weiß	Corning, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatte, 96 full-well, weiß	Corning, Corning, NY, USA
Mikrotiterplatte, 384 well, schwarz	Corning, Corning, NY, USA
NuPAGE™ Bis-Tris Gel 4-12 %, 15 well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR-Platte, 96 well	Ratiolab, Dreieich, DE
Pipettenspitzen RC 10 µL	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
Pipettenspitzen RC 1000 µL	Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA
Pipettenspitzen TipOne® 200 µL	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen TipOne® 300 µL	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen TipOne® 1000 µL	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 200 µL, transparent	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Pipettenspitzen 1250 µL, transparent	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
PP-Röhrchen 5,0 mL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Puffer-Reservoir 300 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reaktionsgefäß 1,5 mL	BRAND, Wertheim, DE
Reaktionsgefäß 1,5 mL LoBind®	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß 5,0 mL LoBind®	Eppendorf, Hamburg, DE

Material	Hersteller
Schraubröhrchen 0,5 mL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Schraubröhrchen 2,0 mL	Sarstedt, Nürmbrecht, DE
Schraubverschlüsse, diverse Farben	Sarstedt, Nürmbrecht, DE

### 3.1.8 Software

Die verwendete Software ist in der Tabelle 3-12 aufgeführt.

**Tabelle 3-12: Software.**

Software	Hersteller
Biomek Software Version 5.1	Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA
Bio-Plex Manager™ Version 6.2	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
EndNote™ X7.8	Thomson Reuters, Toronto, CA
FluidX IntelliCode™ Version 12.2.0.40	Brooks Automation Ltd., Chelmsford, MA, USA
GraphPad Prism 9.3.1	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
PR.ThermControl Version 2.3.1	NanoTemper Technologies, München, DE
RStudio Version 1.2.5001	RStudio, Inc., Boston, MA, USA
xPONENT® Version 4.3	Luminex Corp., Austin, TX, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Proteinanalysen mittels Prometheus NT.48

Der Prometheus NT.48 der Firma NanoTemper Technologies ist ein Gerät zur parallelen Untersuchung der thermischen Stabilität und des Aggregationsverhalten von Proteinen. Die Untersuchung der thermischen Stabilität beruht auf der nanoDSF (Differential Scanning Fluorimetry) Technologie. Bei dieser werden Stabilitätsmessungen unter nativen Bedingungen ohne den Zusatz von Farbstoffen durchgeführt. Veränderungen in der thermischen Stabilität werden ausschließlich über die intrinsische Fluoreszenz der zu analysierenden Proteine nachgewiesen. Durch die Anregung bei 285 nm wird hauptsächlich die intrinsische Fluoreszenz durch die Aminosäure Tryptophan detektiert, aber auch die Fluoreszenz der Aminosäure Tyrosin ist in geringem Maße detektierbar. Die Detektion der Emission erfolgt durch zwei UV-LEDs bei 330 nm und 350 nm. Als Wert für die thermische Stabilität wird die Schmelztemperatur (melting temperature,  $T_m$ ) des Proteins berechnet. Die Schmelztemperatur beschreibt den Zustand, an dem ein Protein in gleichem Maße gefaltet (nativ) und entfaltet (denaturiert) ist. Das Aggregationsverhalten wird durch die Messung des Verlusts der Lichtintensität auf Grund einer Streuung des Lichts bestimmt. Je stärker die Aggregation eines Proteins, umso stärker wird hereinflallendes Licht gestreut und der Anteil an

zurückreflektiertem Licht nimmt ab. Die Temperatur, bei der die Proteinaggregation beginnt, wird als Aggregationstemperatur (aggregation temperature, Tagg) bezeichnet.

Proteinanalysen mit dem Prometheus NT.48 wurden mit den *Borrelia*-Antigenen durchgeführt, um deren Stabilität über einen längeren Zeitraum zu kontrollieren. Da einige Antigene maximal ein Tryptophan oder Tyrosin besaßen, wurden alle Antigene bei der höchstmöglichen Konzentration gemessen. Mussten Antigene verdünnt werden, wurde PBS verwendet. Die Messungen erfolgten als Einfachbestimmung, in Duplikaten oder Triplikaten. Dafür wurden Kapillaren (High Sensitivity Capillaries - Prometheus NT.48 nanoDSF Grade) mit 8-10 µL des jeweiligen Antigens befüllt und in den Prometheus NT.48 eingesetzt. Bei jeder Messung musste zu Beginn die richtige Anregungsintensität eingestellt werden. Diese wurde so gewählt, dass die Fluoreszenz der Antigene sowohl bei 330 nm als auch bei 350 nm im Bereich von 2.000 und 20.000 *counts* lag. Für die Antigene BmpA, OppA-2 und OspA war eine Anregungsintensität von 48 % ausreichend. Die Antigene DbpA, OspC, p41i, p83/100 und VlsE benötigten eine Anregung bei 100 %. Nach Einstellung der Anregungsintensität erfolgte die Messung der intrinsischen Fluoreszenz sowie des zurückreflektierten Lichts von 20 °C bis 95 °C. Es wurde ein Temperaturanstieg von 1 °C pro Minute gewählt. Die anschließende Auswertung erfolgte über die Software PR.ThermControl Version 2.3.1. Für die grafische Darstellung der Schmelz- und Aggregationskurven wurde GraphPad Prism 9.3.1 verwendet. Um verschiedene Messungen miteinander vergleichen zu können, wurden alle Werte auf den Startwert der jeweiligen Messung normalisiert.

### 3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

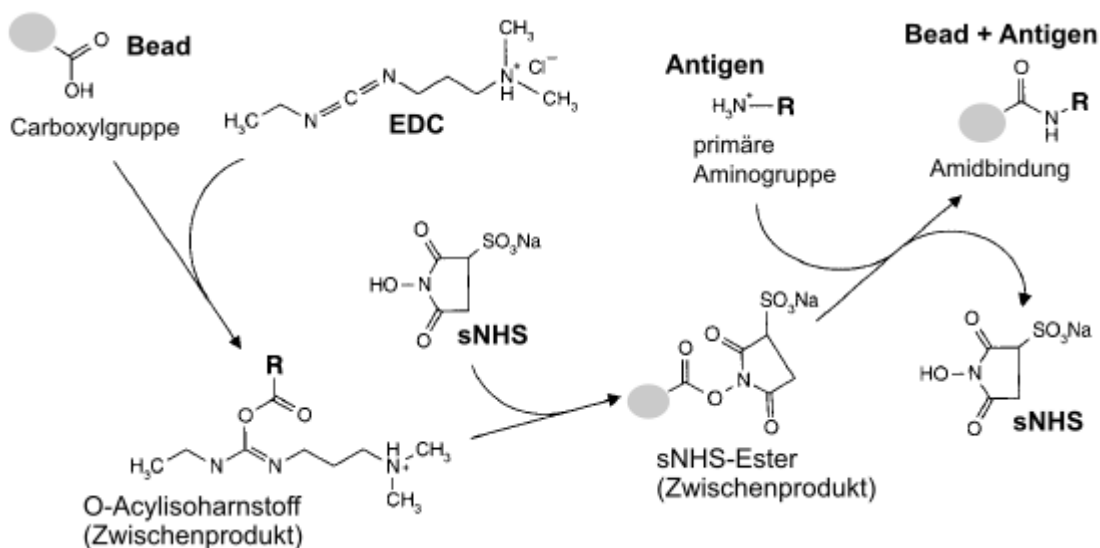
Bei der SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode, bei der Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mit einer Färbelösung sichtbar gemacht werden. Am bekanntesten ist die SDS-PAGE nach Laemmli<sup>83</sup>. Da die Auftrennung der Proteine hier in denaturiertem Zustand stattfindet, werden die Proteine vorab mit einem so genannten Laemmli-Puffer versetzt und erhitzt. Durch das im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) kommt es zur Denaturierung der tertiären und sekundären Proteinstruktur. Zudem erhalten alle Proteine durch das SDS eine negative Gesamtladung, welche für die Migration der Proteine durch das Polyacrylamidgel in Richtung Anode notwendig ist<sup>83,84</sup>. Kleinere Proteine migrieren dabei schneller durch die Poren des Gels als größere Proteine<sup>83</sup>. Die anschließende Färbung mit Coomassie gilt als Standard-Methode, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen<sup>83,84</sup>. Es handelt sich dabei um eine unspezifische Färbung, bei der sich der Farbstoff Coomassie an die aromatischen und basischen Seitenketten der Proteine anlagert<sup>85</sup>.

Die SDS-PAGE wurde verwendet, um die Reinheit der final eingesetzten *Borrelia*-Antigene zu kontrollieren. Es wurde ein XCell SureLock Mini-Cell Elektrophorese-System mit einem

4-12%igen NuPAGE Bis-Tris-Gel verwendet. Die Kammer wurde mit 800 mL 1x NuPAGE MES SDS Running Buffer gefüllt. Vor dem Beladen des Gels wurden 6 µg Antigen mit 4x Laemmli-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 30 µL eingestellt und mit einem Thermocycler (Mastercycler gradient) für 15 min bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurden 10 µL pro Antigen (entspricht 2 µg) mit Hilfe von Kapillarspitzen auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden 4 µL eines PageRuler Plus Prestained Protein Ladder aufgetragen. Danach wurde 1 mL NuPAGE-Antioxidant in die Kammer pipettiert und das System an eine Spannungsquelle (Power Ease 500) angeschlossen. Die Gelelektrophorese wurde bei 200 V durchgeführt. Nach 45 min wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel mit InstantBlue Coomassie Protein Stain 60 min angefärbt. Zur Entfärbung wurde das Gel zweimal jeweils 60 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Gel-Dokumentation wurde ein Typhoon TRIO Variable Mode Imager System verwendet.

### 3.2.3 Immobilisierung von Proteinen an MagPlex Mikrosphären

MagPlex Mikrosphären (Beads) sind carboxylierte paramagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 6,5 µm. Jede Mikrosphäre enthält einen spezifischen Anteil an drei Fluoreszenzfarbstoffen, was eine Unterscheidung in verschiedene Mikrosphären-IDs ermöglicht.



**Abbildung 3-1: Chemische Reaktionen der EDC / sNHS Chemie.**

Die EDC / sNHS Chemie wird für die Immobilisierung von Antikörpern und Antigenen an MagPlex Mikrosphären (Beads) verwendet. In der Abbildung sind die dabei ablaufenden Reaktionen am Beispiel einer Antigen-Immobilisierung gezeigt. Zunächst reagiert das EDC mit der Carboxylgruppe der Mikrosphäre zu einem O-Acylisoharnstoff. Durch das sNHS entsteht dann ein sNHS-Ester. Dieser reagiert mit der primären Aminogruppe des Antigens, wobei das sNHS wieder freigesetzt wird und eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe der Mikrosphäre und der Aminogruppe des Antigens entsteht. [mit Genehmigung entnommen aus Hermanson (2008)<sup>86</sup>, modifiziert]



Die Immobilisierung von Antikörpern und Antigenen an die spektral unterschiedlichen Mikrosphären erfolgte unter Verwendung der 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / N-hydroxysulfosuccinimid (sNHS) Chemie. Abbildung 3-1 zeigt eine Übersicht der chemischen Abläufe am Beispiel einer Antigen-Immobilisierung. Zunächst reagiert das EDC mit der Carboxylgruppe (-COOH) der paramagnetischen Mikrosphäre zu einem O-Acylisoharnstoff. Durch das sNHS entsteht ein sNHS-Ester, welcher mit der primären Aminogruppe (-NH<sub>2</sub> / -<sup>+</sup>NH<sub>3</sub>) des Antigens reagiert. Dabei wird das sNHS wieder freigesetzt und es entsteht eine Amidbindung zwischen der Carboxylgruppe der Mikrosphäre und der primären Aminogruppe des Antigens.

### **Manuelle Immobilisierung**

Die Immobilisierung der Antikörper ms-a-huCXCL13, gt-a-huCXCL13 und rb-a-huCXCL13 erfolgte manuell in einem 1,5 mL LoBind Reaktionsgefäß. Für die Immobilisierung wurden entweder 100 µL (1,25 x 10<sup>6</sup> Beads) oder 500 µL (6,25 x 10<sup>6</sup> Beads) des Mikrosphären-Stocks (12,5 x 10<sup>6</sup> Beads) verwendet. Jeder Antikörper wurde mit einer Konzentration von 7,5 µg Antikörper pro 10<sup>6</sup> Beads immobilisiert. Dafür wurden die Mikrosphären zunächst gründlich gevortext und für 3 min im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurden die Mikrosphären mit Hilfe eines Magneten für 1,5 mL Reaktionsgefäße (DynaMag Spin) dreimal mit 500 µL Aktivierungspuffer gewaschen. Für die Aktivierung der Mikrosphären wurden 100 µL (1,25 x 10<sup>6</sup> Beads) bzw. 150 µL (6,25 x 10<sup>6</sup> Beads) Aktivierungsmix zugegeben und die Mikrosphären Licht-geschützt auf einem Hula-Mixer für 20 min bei RT inkubiert. Für den HulaMixer wurden folgende Einstellungen verwendet: orbital 10 rpm, 35 sec - reciprocal 76 °C, 20 sec - vibro/pause 5 °C, 5 sec. Nach der Inkubation wurden die Mikrosphären dreimal mit 500 µL gewaschen und die benötigte Menge Antikörper zusammen mit Kopplungspuffer für ein Kopplungsvolumen von 500 µL (1,25 x 10<sup>6</sup> Beads) bzw. 750 µL (6,25 x 10<sup>6</sup> Beads) zugegeben. Nach einer Inkubation auf dem HulaMixer für 2 h wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 500 µL PBST entfernt und die Mikrosphären in 100 µL (1,25 x 10<sup>6</sup> Beads) bzw. 500 µL (6,25 x 10<sup>6</sup> Beads) Lagerungspuffer resuspendiert. Die immobilisierten Antikörper wurden abschließend bei 4 °C gelagert.

### **KingFisher-Immobilisierung**

Die Immobilisierung der *Borrelia*- und *Treponema*-Antigene erfolgte mit einem Magnetpartikelprozessor (KingFisher 96 oder KingFisher Flex). Je nach Bedarf wurden 100 µL (1,25 x 10<sup>6</sup> Beads), 300 µL (3,75 x 10<sup>6</sup> Beads), 600 µL (7,5 x 10<sup>6</sup> Beads) oder 1000 µL (12,5 x 10<sup>6</sup> Beads) des Mikrosphären-Stocks verwendet. Die Kopplungskonzentration betrug je nach Antigen 0,50 - 20,00 µg / 10<sup>6</sup> Beads (Tabelle 3-13). Zusätzlich wurden Mikrosphären

mit einem gt-a-hulgG und einem dk-a-hulgM Antikörper sowie humanem IgG und humanem IgM immobilisiert. Diese wurden später als Assay-Kontrollen eingesetzt.

**Tabelle 3-13: Kopplungskonzentrationen der KingFisher-Immobilisierung.**

Pathogen	Antigen	Kopplungskonz. µg / 10 <sup>6</sup> Beads
<i>Borrelia</i>	BmpA - PKo	1,25
	DbpA - ZS7	10,00
	DbpA - 20047	10,00
	DbpA - PKo	5,00
	DbpA - A14S	10,00
	DbpA - PBi	10,00
	OppA-2 - PBi	1,25
	OspA - PKo	20,00
	OspC - B31	10,00
	OspC - 20047	5,00
	OspC - PKo	5,00
	OspC - A14S	5,00
	OspC - PBi	1,25
	p41i - PKo	1,25
	p83/100 - PKo	0,50
	VlsE - B31	1,25
<i>Treponema</i>	TmpA	1,25
	Tpp15	1,25
	Tpp17	1,25
	Tpp47	1,25
Assay-Kontrollen	gt-a-hulgG	2,50
	dk-a-hulgM	5,00
	hulgG	2,50
	hulgM	10,00

Wie auch bei der manuellen Immobilisierung wurden die Mikrosphären zunächst gevortext und für 3 min im Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurden zehn KingFisher deep-well 96 Platten für die einzelnen Immobilisierungsschritte (Tabelle 3-14) vorbereitet.

**Tabelle 3-14: Immobilisierungsschritte der KingFisher-Immobilisierung.**

Platte	Schritt	Bezeichnung
1	Start	Beads in 0,005 % Triton X-100
2	Waschen	Aktivierungspuffer
3	Waschen	Aktivierungspuffer
4	Aktivierung	Aktivierungsmix
5	Waschen	Kopplungspuffer
6	Waschen	Kopplungspuffer
7	Kopplung	Antigene in Kopplungspuffer
8	Waschen	Waschpuffer
9	Waschen	Waschpuffer
10	Ende	Lagerungspuffer

Für den Start wurden die Mikrosphären zusammen mit 0,065 % Triton X-100 (ergibt final 0,005 %) in die erste Platte vorgelegt. Dann wurden die Mikrosphären zunächst zweimal in Aktivierungspuffer (Platte 2 + 3) gewaschen und so auf die Aktivierung vorbereitet. Für die Aktivierung wurden die Mikrosphären 20 min im Aktivierungsmix (Platte 4) inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Kopplungspuffer (Platte 5 + 6). Platte 7 enthielt die zu immobilisierenden Antigene. Diese wurden vorab entsprechend der benötigten Kopplungskonzentration mit Kopplungspuffer verdünnt. Die Mikrosphären wurden zusammen mit den Antigenen 2 h inkubiert. Danach folgten zwei letzte Waschschrte mit Waschpuffer (PBS + 0.005 % Triton X-100, Platte 8 + 9). Am Ende wurden die Mikrosphären in 250  $\mu\text{L}$  (1,25 / 3,75  $\times 10^6$  Beads) bzw. 500  $\mu\text{L}$  (7,5 / 12,5  $\times 10^6$  Beads) Lagerungspuffer (Platte 10) transferiert und über Nacht bei 4 °C Licht-geschützt gelagert. Je nach Mikrosphären-Menge wurden für die einzelnen Schritte unterschiedliche Volumina benötigt. Diese sind der Tabelle 3-15 zu entnehmen.

**Tabelle 3-15: Volumina der KingFisher-Immobilisierung.**

Bead-Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Bead-Menge $\times 10^6$	Volumen 0,065 % Triton ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Waschen ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Aktivierung ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Kopplung ( $\mu\text{L}$ )
100	1,25	8,3	250	150	125
300	3,75	25,0	250	150	125
600	7,5	50,0	500	300	250
1000	12,5	83,0	500	300	500

Am nächsten Tag wurden die Mikrosphären in 1,5 mL LoBind Reaktionsgefäße überführt. Mit Hilfe des Magneten für 1,5 mL Reaktionsgefäße wurde das gesamte Puffervolumen abgenommen und die Mikrosphären je nach Ausgangsvolumen wieder in Lagerungspuffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

### nicht-funktionelle Immobilisierungskontrolle

Bei einer Immobilisierung von Antikörpern ist es möglich eine nicht-funktionelle Immobilisierungskontrolle durchzuführen. Es handelt sich dabei lediglich um den Nachweis, dass sich Antikörper auf den Mikrosphären befinden. Eine Aussage über die Funktionalität der Antikörper kann hiermit nicht getroffen werden.

Für die nicht-funktionelle Immobilisierungskontrolle nach der manuellen Immobilisierung der verschiedenen  $\alpha$ -huCXCL13 Antikörper wurden die entsprechenden Mikrosphären mit einem zum jeweiligen Antikörper passenden PE-konjugierten Spezies-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Mikrosphären wurden dafür 1:500 in BRE + 0,05 % Tween20 verdünnt. Von den Spezies-spezifischen Antikörpern wurde eine Verdünnungsreihe von 10,0 bis 0,001  $\mu\text{g/mL}$  angelegt. Jede Verdünnungsstufe wurde in Duplikaten gemessen. Als erstes wurden 50  $\mu\text{L}$  der verdünnten Mikrosphären in eine 96 half-well Mikrotiterplatte pipettiert. Mit Hilfe eines

Plattenmagneten wurden die Mikrosphären am Plattenboden fixiert und der Überstand verworfen. Dann folgte die Zugabe des Spezies-spezifischen Antikörpers und eine 45-minütige Inkubation auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) bei 21 °C und 700 rpm. Nach der Inkubation wurden die Mikrosphären dreimal mit 100 µL Waschpuffer (PBST) gewaschen und in 100 µL desselbigen Puffers resuspendiert. Die Messung der MFI-Signale erfolgte an einer FLEXMAP 3D bei folgenden Einstellungen: Probenvolumen = 80 µL, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 100 Beads / ID, Standard PMT.

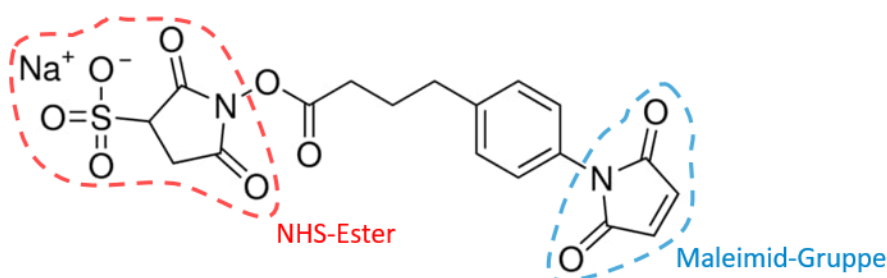
### 3.2.4 Immobilisierung von Peptiden an MagPlex Mikrosphären

Die Immobilisierung von Peptiden an MagPlex Mikrosphären erfolgt in der Regel über ein Trägerprotein. Für Peptide mit einem Doa-Doa-Linker und einem N-terminalen Cystein wird BSA als Trägerprotein verwendet. Peptide mit einem Ttds-Linker und einem N-terminalen Biotin werden über Streptavidin als Trägerprotein immobilisiert.

#### Immobilisierung über BSA

Für die Immobilisierung von Peptiden über BSA wurde dieses mit einer Kopplungskonzentration von  $3,33 \mu\text{g} / 10^6 \text{Beads}$  an die Mikrosphären immobilisiert. Dies erfolgte parallel zur Immobilisierung der *Borrelia*- und *Treponema*-Antigene mit einem Magnetpartikelprozessor. Die Mikrosphären wurden am Ende jedoch in PBS + 0,005 % Triton X-100 und nicht im üblichen Lagerungspuffer gelagert. Die Peptide Cys-Doa-Doa-VlsE und Cys-Doa-Doa-OspC wurden zunächst in 100 % DMSO bei 4 mM gelöst und dann mit PBS auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt. DMSO ist ein bekanntes Lösungsmittel in der Peptidchemie und ist vor allem für das Lösen von hydrophoben Peptiden geeignet. Da es jedoch in zu hoher Konzentration die Immobilisierung stören kann, konnten die Peptide nicht direkt bei der später benötigten Konzentration von 1 mM gelöst werden. Ein Lösen der Peptide in PBS war nicht möglich, da beide Peptide zu mehr als 50 % hydrophobe Aminosäuren besaßen. Für die Immobilisierung wurde sulfo-SMPB (Sulfosuccinimidyl-4-(P-maleimidophenyl)butyrat, Abbildung 3-2) verwendet. Es besitzt einen NHS-Ester zur Reaktion mit primären Aminogruppen (hier: BSA) und eine Maleimid-Gruppe zur Reaktion mit Sulfhydrylgruppen (-SH, hier: N-terminales Cystein des Peptids). Dadurch entsteht eine Thioether-Verbindung ( $\text{R}^1\text{-S-R}^2$ ). Auch das sulfo-SMPB wurde zunächst bei einer Konzentration von 15 mg/mL in DMSO gelöst und anschließend 1:10 in PBS verdünnt. Die Immobilisierung der Peptide erfolgte manuell in einem 1,5 ml LoBind Reaktionsgefäß. Pro Peptid wurden 100 µL BSA-Mikrosphären eingesetzt. Als erstes wurde der zur Lagerung verwendete Puffer mit Hilfe des Magneten für 1,5 mL Reaktionsgefäße entfernt. Zu den BSA-Mikrosphären wurden dann 150 µL des verdünnten sulfo-SMPB und 150 µL PBS gegeben. Damit lag die finale sulfo-SMPB-Konzentration bei einem Anteil von 5 % DMSO bei

0,75 mg/mL. Es folgte eine Inkubation für 60 min auf dem HulaMixer (Licht-geschützt, RT). In dieser Zeit wurden die Peptide zur Reduktion von eventuell entstandenen Disulfidbrücken mit einer äquimolaren Menge TCEP (1 mM in PBS) behandelt. Die Peptide wurden zusammen mit dem TCEP für 20 min auf dem HulaMixer inkubiert und im Anschluss mit 150  $\mu$ L PBS auf eine finale Konzentration von 0,2 mM verdünnt. Das DMSO wurde so auf 5 % reduziert. Nach der 60-minütigen Inkubation der BSA-Mikrosphären wurden diese dreimal mit 500  $\mu$ L gewaschen und die gesamte Peptid-Lösung zugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation für 60 min. Im letzten Schritt wurden die BSA-Mikrosphären erneut dreimal mit 500  $\mu$ L PBS gewaschen und in 100  $\mu$ L Lagerungspuffer resuspendiert. Die immobilisierten Peptide wurden bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 3-2: Strukturformel von sulfo-SMPB.**

Sulfo-SMPB ist ein wasserlösliches Molekül, welches zur kovalenten Verknüpfung von Molekülen mit primären Aminogruppen und Sulfhydrylgruppen verwendet wird. Die Reaktion mit primären Aminogruppen erfolgt über einen NHS-Ester. Für die Reaktion mit Sulfhydrylgruppen besitzt das Molekül eine Maleimid-Gruppe. [entnommen aus Sigma-Aldrich Product Page (2022)<sup>87</sup>, modifiziert]

### Immobilisierung über Streptavidin

Für die Immobilisierung von Peptiden über Streptavidin wurde das Streptavidin mit einer Kopplungskonzentration von 16,67  $\mu$ g /  $10^6$  Beads an die Mikrosphären immobilisiert. Allerdings wurde statt des üblichen Kopplungspuffers 100 mM MES + 0,01 % Triton X-100 verwendet und die Lagerung der Streptavidin-Mikrosphären erfolgt in PBS + 0,05 % ProClin 300. Anders als bei der Immobilisierung über BSA werden die Peptide bei der Immobilisierung über Streptavidin nicht kovalent gebunden. Die Bindung ist daher weniger stabil, was ein häufigeres Immobilisieren in kleineren Ansätzen (20  $\mu$ L Streptavidin-Mikrosphären) notwendig macht. Auch hier wurde zu Beginn der zur Lagerung verwendete Puffer der Streptavidin-Mikrosphären mit Hilfe eines Magneten abgenommen. Die Peptide Biotin-Ttds-VIsE und Biotin-Ttds-OspC wurden wie auch die anderen Peptide in DMSO bei 4 mM gelöst und mit PBS auf 1 mM verdünnt. 20  $\mu$ L der verdünnten Peptide wurden zusammen mit 80  $\mu$ L CBST zu den Streptavidin-Mikrosphären gegeben und für 2 h Licht-geschützt bei RT auf dem HulaMixer inkubiert. Die finale Peptidkonzentration betrug somit auch hier bei 5 % DMSO 0,2 mM. Nach der Inkubation wurden die Streptavidin-Mikrosphären dreimal mit 500  $\mu$ L CBST gewaschen. Um noch freies Streptavidin auf den Mikrosphären zu

blockieren, wurden 50  $\mu\text{L}$  inaktiviertes sulfo-NHS-LC-LC-Biotin zugegeben. Dadurch sollten spätere Kreuzreaktionen im Assay verhindert werden. Das sulfo-NHS-LC-LC-Biotin wurde einen Tag vor der Immobilisierung in TBST bei 50 mM gelöst und vor der Zugabe mit CBST auf 5 mM verdünnt. Die Streptavidin-Mikrosphären wurden 30 min mit dem sulfo-NHS-LC-LC-Biotin inkubiert. Abschließend wurden die Mikrosphären nochmals mit 3x 500  $\mu\text{L}$  CBST gewaschen und in 20  $\mu\text{L}$  PBS + 0,05 % ProClin 300 resuspendiert. Die Lagerung der immobilisierten Peptide erfolgte bei 4 °C.

### 3.2.5 Biotinylierung von Proteinen

#### Biotinylierung

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin B7) mit einer molaren Masse von 244 g/mol<sup>88</sup>. Es besitzt eine sehr hohe Affinität zu Streptavidin, einem ~56 kDa großen Protein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. Die Bindung gilt als hoch selektiv und stabil<sup>89</sup>. Über eine reaktive Carboxylgruppe kann Biotin an andere Biomoleküle gebunden werden, ohne dabei dessen immunologische Reaktionsfähigkeit zu beeinträchtigen<sup>88</sup>. In Immunoassays erfolgt die kovalente Bindung oft an Antikörper, welche anschließend in Kombination mit einem Fluoreszenz-markierten Streptavidin zur Detektion verwendet werden<sup>88,89</sup>.

Für die Kopplung von Biotin an die Antikörper ms-a-huCXCL13, gt-a-huCXCL13 und rb-a-huCXCL13 wurde ein sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (670 g/mol) verwendet, bei dem das Biotin über einen LC-LC-Linker kovalent an frei liegende primäre Aminogruppen des Antikörpers gekoppelt wird. Die Kopplung erfolgte in PBS über Nacht bei 4 °C. Je nach Bedarf wurden 20-50  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Antikörpers verwendet. Das sulfo-NHS-LC-LC-Biotin wurde unabhängig von der Antikörpermenge in 200-fachem Überschuss eingesetzt. Dafür wurde das lyophilisierte Biotin so in PBS gelöst, dass final je Antikörper 2  $\mu\text{L}$  des gelösten Biotins benötigt wurden. Eine Übersicht über die benötigte Menge an Biotin und die einzustellende Biotin-Konzentration bei unterschiedlichen Antikörpermengen findet sich in der Tabelle 3-16.

**Tabelle 3-16: Biotin-Menge und -Konzentration für die Antikörper-Biotinylierung.**

	Menge Antikörper		
	20 $\mu\text{g}$	25 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$
<b>Stoffmenge Antikörper (nmol)</b>	0,13	0,17	0,33
<b>Stoffmenge Biotin (nmol)</b>	26,67	33,33	66,67
<b>Menge Biotin (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	17,86	22,33	44,65
<b>Konzentration Biotin (mg/mL)</b>	8,91	11,16	22,33

Um ungebundenes Biotin zu entfernen wurden die Antikörper nach der Inkubation mit Hilfe von Centri-Sep Spin Columns aufgereinigt. Die Aufreinigung mit Centri-Sep Spin Columns beruht auf dem Prinzip der nach Sambrook et al. (1989)<sup>90</sup> beschriebenen Gelfiltration zur Aufreinigung von DNA aus nick translation Reaktionen. Zunächst musste das in einem

Mikroröhrchen enthaltene Gel mit 650  $\mu\text{L}$  PBS für 30 min hydratisiert werden. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung von überschüssigem PBS bei 750 g und RT für 2 min zentrifugiert. Dann wurde die Biotin/Antikörper-Lösung mittig auf das Gel aufgetragen, wobei das Reaktionsgefäß je nach Antikörpermenge mit 20-40  $\mu\text{L}$  PBS nachgespült wurde. Bei einer erneuten Zentrifugation für 3 min bei 750 g wurde der biotinylierte Antikörper in einem neuen Reaktionsgefäß aufgefangen. Das deutlich kleinere Biotin verblieb in den Poren des Gels. Mit Hilfe einer Pipette wurde das aufgefangene Volumen der Antikörper-Lösung bestimmt. Die Antikörperkonzentration wurde mit einem Mikrovolumen-Spektralphotometer (NanoDrop 2000) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten. Als Referenz wurde PBS verwendet. Bei einer Antikörperkonzentration über 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  wurde die Konzentration mit PBS auf 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingestellt. Die biotinylierten Antikörper wurden bei 4 °C gelagert.

### **nicht-funktionelle Biotinylierungskontrolle**

Zur Kontrolle der Biotinylierung wurde eine nicht-funktionelle Biotinylierungskontrolle durchgeführt. Bei dieser wird der biotinylierte Antikörper zunächst von 1000 ng/mL bis 0,1 ng/mL (Verdünnungsfaktor 1:10) verdünnt und anschließend 25  $\mu\text{L}$  jeder Verdünnung mit 25  $\mu\text{L}$  immobilisierten Spezies-spezifischen Antikörpern in einer 96 half-well Mikrotiterplatte inkubiert. Für die Verdünnung des biotinylierten Antikörpers wurde BRE mit 0,05 % Tween20 verwendet. Die immobilisierten Spezies-spezifischen Antikörper wurden ebenfalls in BRE + 0,05 % Tween20 mit einem Verdünnungsfaktor von 1:250 verdünnt. Die Inkubation erfolgte auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) für 2 h bei 21 °C und 650 rpm. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene biotinylierte Antikörper durch 2x Waschen der Mikrosphären mit Hilfe eines Plattenmagnets entfernt. Pro well wurde mit 100  $\mu\text{L}$  PBST gewaschen. Zur Detektion der gebundene Antikörper wurden pro well 30  $\mu\text{L}$  eines PE-konjugierten Streptavidins zugegeben (PJ31S - 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in BRE + 0.05 % Tween20). Nach einer erneuten Inkubation von 30 min bei 21 °C und 650 rpm wurde überschüssiges Streptavidin mit Hilfe des Plattenmagnets entfernt und die Mikrosphären in 100  $\mu\text{L}$  PBST resuspendiert. Die anschließende Messung der MFI-Signale erfolgte in Duplikaten an einer FLEXMAP 3D. Es wurden folgende Einstellungen verwendet: Probenvolumen = 80  $\mu\text{L}$ , Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 100 Beads / ID, Standard PMT.

### **3.2.6 PE-Konjugation von Proteinen**

#### **PE-Konjugation**

Phycoerythrin (PE) ist ein rot fluoreszierendes Phycobiliprotein mit einer molaren Masse von 240.000 g/mol<sup>91</sup>. Es stammt aus Rotalgen (R-PE + B-PE)<sup>91</sup> oder Cyanobakterien (C-PE)<sup>91</sup> und wird auf Grund seiner spektralen Eigenschaften seit mehr als 25 Jahren bei Immunfluoreszenzexperimenten eingesetzt<sup>91,92</sup>.

Für die Konjugation von R-PE an die Antikörper ms-a-huCXCL13, gt-a-huCXCL13 und rb-a-huCXCL13 wurde eine Lightning-Link R-Phycoerythrin Conjugation Kit verwendet. Das Kit besteht aus einem LL Mix, einem LL Modifier und einem LL Quencher. Die Antikörper wurden bei einer Konzentration von 1 mg/mL verwendet, wobei jeweils 10 µg ( $\cong$  10 µL) eingesetzt wurden. Als erstes musste der LL Modifier zugegeben werden. Pro 10 µL Antikörper wurde 1 µL des Reagenzes benötigt. Anschließend wurde je Antikörper ein Vial mit lyophilisiertem LL Mix für 10 µg Antikörper verwendet. Die mit dem LL Modifier versetzten Antikörper wurden direkt auf das Lyophilisat pipettiert. Nachdem dieses gelöst war, wurde die äquimolare Antikörper/R-PE Mischung über Nacht im Dunkeln bei RT gelagert. Am nächsten Tag musste der LL Quencher zugegeben werden. Auch hier wurde 1 µL Quencher pro 10 µL Antikörper eingesetzt. Nach weiteren 30 min konnten die PE-konjugierten Antikörper verwendet werden. Die Lagerung erfolgte licht-geschützt bei 4 °C.

### **nicht-funktionelle Konjugationskontrolle**

Zur Kontrolle der PE-Konjugation wurde eine nicht-funktionelle Konjugationskontrolle durchgeführt. Es wurden die gleichen immobilisierten Spezies-spezifischen Antikörper wie bei der Biotinylierungskontrolle (siehe 3.2.5 Biotinylierung von Proteinen) verwendet. Die immobilisierten Antikörper wurden 1:250 in BRE + 0,05 % Tween20 verdünnt und 25 µL in eine 96 half-well Mikrotiterplatte pipettiert. Von den PE-konjugierten Antikörpern wurde eine Verdünnungsreihe von 10 µg/mL bis 0,001 µg/mL (Verdünnungsfaktor 1:10) angelegt. Die Verdünnung erfolgte ebenfalls in BRE + 0,05 % Tween20. Von jeder Verdünnung wurden 25 µL zu den Mikrosphären mit den entsprechenden Spezies-spezifischen Antikörpern pipettiert. Nach einer Inkubation auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) für 45 min bei 21 °C und 700 rpm, wurden die Mikrosphären unter Verwendung eines Plattenmagnets dreimal mit 100 µL PBST gewaschen und am Ende in 100 µL PBST resuspendiert. Die Messung der MFI-Signale erfolgte in Duplikaten an einer FLEXMAP 3D. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Probenvolumen = 80 µL, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 100 Beads / ID, Standard PMT.

### **3.2.7 Multiplexe Immunoassays**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Tests zum Nachweis einer Lyme-Borreliose bzw. Neuroborreliose entwickelt. Zudem wurden Proben mit einem kommerziell erhältlichen multiplexen Immunoassay gemessen.

Um die Stabilität der entwickelten Assays zu kontrollieren, wurden bei jeder Messung Qualitätskontrollproben (QC-Proben) mitgeführt. Die QC-Proben wurden durch 200-fache Verdünnung von Serum in Assaypuffer hergestellt. Zudem wurden Mikrosphären mit humanem IgG und humanem IgM eingesetzt, um die Zugabe des entsprechenden



Detektionssysteme zu kontrollieren. Mikrosphären mit einem gt-a-hulgG Antikörper und einem dk-a-hulgM Antikörper wurden zur Kontrolle der Probenbeladung eingesetzt. Bei jedem Assay wurde auch das Hintergrundsignal (blank) gemessen.

### **Borrelia multiplex**

Der Borrelia multiplex wurde für den Nachweis Borrelien-spezifischer IgG/IgM-Antikörper im Serum entwickelt. Er kann auf zwei verschiedenen Luminex-Plattformen (FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX) verwendet werden. Für die Messungen wurde ein Mikrosphären-Mix mit  $1,0 \times 10^6$  Beads/mL pro Antigen / Assay-Kontrolle hergestellt.

#### Borrelia multiplex - FLEXMAP 3D

Mit der FLEXMAP 3D kann pro well eine Antikörperklasse (IgG oder IgM) nachgewiesen werden. Für die Messung wurde der zuvor hergestellte Mikrosphären-Mix 1:25 in Assaypuffer verdünnt. Die zu messenden Proben wurden 1:200 in Assaypuffer verdünnt und dann mit dem verdünnten Mikrosphären-Mix im Verhältnis 1:1 (25  $\mu$ L Mikrosphären / Probe, finale Probenverdünnung 1:400) in einer 96 half-well Mikrotiterplatte für 2h auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) bei 21 °C und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosphären dreimal mit 100  $\mu$ L PBST gewaschen und resuspendiert. Dafür wurde der Mikroplatten-Washer MultiFlo FX benutzt. Nach dem Waschen wurden die Mikrosphären auf zwei 96 half-well Mikrotiterplatten aufgeteilt. Eine Platte wurde dann für den IgG-Nachweis verwendet, die andere für den IgM-Nachweis. Für den IgG-Nachweis wurde ein PE-konjugierter anti-human IgG Antikörper aus der Ziege (gt-a-hulgG-PE) bei einer Konzentration von 3  $\mu$ g/mL verwendet. Für den IgM-Nachweis wurde ein PE-konjugierter anti-human IgM Antikörper aus dem Esel (dk-a-hulgM-PE) bei einer Konzentration von 5  $\mu$ g/mL eingesetzt. In jedes well mit Mikrosphären wurden 30  $\mu$ L des entsprechenden Antikörpers pipettiert und die Mikrosphären anschließend für 45 min bei 21 °C und 750 rpm inkubiert. Um ungebundene Detektionsantikörper zu entfernen, wurden die Mikrosphären danach dreimal in 100  $\mu$ L PBST gewaschen. Auch hier wurde der Mikroplatten-Washer MultiFlo FX verwendet. Final wurden die Mikrosphären in 100  $\mu$ L PBST resuspendiert und vor der Messung noch einmal mit einem Plattenschüttler für 3 min bei 21 °C und 1000 rpm aufgeschüttelt. Für die Messung der MFI-Signale wurden folgende Einstellungen gewählt: Probenvolumen = 80  $\mu$ L, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 50 Beads / ID, Standard PMT.

#### Borrelia multiplex - INTELLIFLEX

Bei einer INTELLIFLEX ist eine simultane IgG/IgM-Detektion möglich. Für die Messung wurde der zuvor hergestellte Mikrosphären-Mix 1:50 in Assaypuffer verdünnt. Die Proben wurden wie bei der Messung an einem FLEXMAP 3D Gerät vorbereitet und mit den Mikrosphären für 2 h bei 21 °C und 750 rpm auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort)

inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosphären dreimal mit 100 µL PBST unter Verwendung des Mikroplatten-Washer MultiFlo FX gewaschen, jedoch nicht resuspendiert. Anstatt die Mikrosphären auf zwei Platten aufzuteilen, wurden die Detektionssysteme für IgG und IgM direkt zugegeben. Für den IgG-Nachweis wurde ein biotinylierter anti-human IgG Antikörper aus der Ziege (gt-a-hulgG-Biotin) bei einer Konzentration von 1 µg/mL verwendet. Für den IgM-Nachweis wurde wieder der PE-konjugierte anti-human IgM Antikörper aus dem Esel (dk-a-hulgM-PE) bei einer Konzentration von 5 µg/mL eingesetzt. Für die simultane Detektion wurde ein Mix aus beiden Antikörpern hergestellt und in jedes well mit Mikrosphären 30 µL pipettiert. Nach einer Inkubation für 45 min bei 21 °C und 750 rpm, wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen der Mikrosphären mit 100 µL PBST entfernt. Für den Nachweis der IgG-Antikörper mussten die Mikrosphären anschließend mit einem Brilliant Violet 421 (BV421) konjugierten Streptavidin inkubiert werden. Das Streptavidin wurde bei einer Konzentration von 0,2 µg/mL eingesetzt. In jedes well mit Mikrosphären wurden 30 µL Streptavidin pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 21 °C und 750 rpm für 30 min. Abschließend wurden die Mikrosphären erneut dreimal in 100 µL PBST gewaschen, resuspendiert und für 3 min bei 21 °C und 1000 rpm aufgeschüttelt. Für die Messung der MFI-Signale wurden folgende Einstellungen verwendet: Probenvolumen = 80 µL, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 50 Beads / ID, Dual Reporter System

#### Assay-Automatisierung

Um Proben im Hochdurchsatz messen zu können, wurde das INTELLIFLEX Protokoll des *Borrelia multiplex* an eine halbautomatisierte Durchführung mittels Pipettierroboter (Biomek i7) angepasst. Anstatt einer 96 half-well Mikrotiterplatte wurde eine 384 well Platte verwendet. Für das Waschen der Mikrosphären nach den Inkubationsschritten wurde der Mikroplatten-Washer 405 TS benutzt. Die Inkubation der Mikrosphären erfolgte bei 1450 rpm. Vor der Messung wurden die Mikrosphären für 5 min bei 21 °C und 1800 rpm aufgeschüttelt. Die Messung der MFI-Signale erfolgte mit folgenden Einstellungen: Probenvolumen = 60 µL, Zeitlimit pro well: 80 sec, Bead-Zahl: 40 Beads / ID, Dual Reporter System.

#### **Borrelia neuroplex**

Der *Borrelia neuroplex* besteht aus einem serologischen Assay zum Nachweis von Borrelien-spezifischen Antikörpern im Serum oder CSF und einem Immunoassay zur Quantifizierung von CXCL13 im CSF. Zusätzlich wurden für eine Differentialdiagnostik Mikrosphären mit *Treponema*-Antigenen in den Assay integriert. Alle Messungen mit dem *Borrelia neuroplex* erfolgten auf der FLEXMAP 3D Plattform.

Auch für diesen Assay wurde ein Mikrosphären-Mix mit  $1,0 \times 10^6$  Beads/mL pro Antigen/Assay-Kontrolle hergestellt.

### Borrelia neuroplex - Serum

Als erstes wurde der vorbereitete Mikrosphären-Mix 1:25 in Assaypuffer verdünnt. Die Serum-Proben wurden 1:800 verdünnt. 25 µL einer Probe wurden dann mit 25 µL Mikrosphären in einer 96 half-well Mikrotiterplatte inkubiert (finale Probenverdünnung 1:1600). Die Inkubation erfolgte auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) bei 21 °C und 750 rpm für 2 h. Nach der Inkubation wurden die Mikrosphären dreimal mit 100 µL PBST unter Verwendung des Mikroplatten-Washers MultiFlo FX gewaschen. Anschließend wurden die Mikrosphären für 1 h bei 21 °C und 750 rpm in 30 µL Assaypuffer pro well inkubiert. Es handelt sich dabei um einen Zwischenschritt, welcher für die parallele Messung von Serum- und CSF-Proben auf einer Platte notwendig war. Nach diesem Zwischenschritt wurden die Mikrosphären wieder dreimal in 100 µL PBST gewaschen und in 100 µL PBST resuspendiert. Die Mikrosphären wurden dann auf zwei 96 half-well Platten verteilt. Die erste Platte wurde für die IgG-Detektion verwendet, die zweite Platte für die IgM-Detektion. Für die IgG-Detektion wurden 30 µL des gt-a-hulgG-PE Antikörpers bei einer Konzentration von 3 µg/mL verwendet. Die IgM-Detektion erfolgte mit 30 µL des dk-a-hulgM-PE Antikörpers bei einer Konzentration von 5 µg/mL. Die Mikrosphären wurden mit dem jeweiligen PE-konjugierten Antikörper für 30 min bei 21 °C und 750 rpm inkubiert. Abschließend wurden die Mikrosphären erneut dreimal gewaschen, resuspendiert und bei 21 °C und 1000 rpm für 3 min inkubiert. Die MFI-Messung erfolgte an einem FLEXMAP 3D Gerät bei den üblichen Einstellungen (Probenvolumen = 80 µL, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 50 Beads / ID, Standard PMT).

### Borrelia neuroplex - CSF

Auch bei der Messung von CSF-Proben wurde der vorab hergestellte Mikrosphären-Mix 1:25 in Assaypuffer verdünnt. Die CSF-Proben wurden 1:5 verdünnt. Für eine Quantifizierung des CXCL13 wurde mit rekombinantem humanem CXCL13 eine Standardkurve (STD-Kurve) erstellt. Dafür wurde das humane CXCL13 zunächst auf eine Konzentration von 20.000 pg/mL mit PBS + 0,5 % BSA verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden mehrere Aliquots bei -20 °C gelagert und für jede STD-Kurve ein frisches Aliquot verwendet. Für den obersten STD-Kurvenpunkt wurde das aufgetaute Aliquot in Assaypuffer auf eine Konzentration von 3.030 pg/mL verdünnt. Ausgehend von dem obersten STD-Kurvenpunkt wurde dann eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1:3) bis zu einem siebten STD-Kurvenpunkt mit einer Konzentration von 4,16 pg/mL angelegt. Im späteren Assay wurde die STD-Kurve durch die Inkubation mit den Mikrosphären nochmals um den Faktor 1:2 verdünnt. Die Konzentrationen der einzelnen STD-Kurvenpunkte sind in der Tabelle 3-17 aufgeführt.

Tabelle 3-17: STD-Kurvenpunkte CXCL13.

STD-Kurvenpunkt	Konz. (pg/mL) Ansatz	Konz. (pg/mL) Assay
STD 1	3.030	1.515
STD 2	1.010	505
STD 3	337	168
STD 4	112	56,1
STD 5	37,4	18,7
STD 6	12,5	6,24
STD 7	4,16	2,08

25  $\mu$ L CSF / STD wurden zusammen mit 25  $\mu$ L Mikrosphären-Mix (finale Probenverdünnung 1:10) für 2 h bei 21 °C und 750 rpm auf einem Plattenschüttler (ThermoMixer C / Thermomixer comfort) inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosphären dreimal mit 100  $\mu$ L PBST gewaschen. Es wurde der Mikroplatten-Washer MultiFlo FX verwendet. Für die Detektion von CXCL13 wurde dann 30  $\mu$ L des biotinylierten gt-a-huCXCL13 Antikörpers (siehe 3.2.5 Biotinylierung von Proteinen) bei einer Konzentration von 3  $\mu$ g/mL zugegeben und die Mikrosphären für 1 h bei 21 °C und 750 rpm inkubiert. Danach wurden die Mikrosphären erneut dreimal mit 100  $\mu$ L PBST gewaschen, resuspendiert und auf zwei 96 half-well Mikrotiterplatten aufgeteilt. Die erste Platte wurde für die IgG-Detektion benötigt. Pro well wurden 30  $\mu$ L des gt-a-hulgG-PE Antikörpers (Konzentration: 3  $\mu$ g/mL) pipettiert. Die zweite Platte wurde für die parallele Detektion von IgM und CXCL13 verwendet. Dafür wurde ein Mix aus dem dk-a-hulgG-PE Antikörper (IgM-Detektion, Konzentration: 5  $\mu$ g/mL) und einem PE-konjugierten Streptavidin (CXCL13-Detektion, Konzentration: 2  $\mu$ g/mL) hergestellt und pro well 30  $\mu$ L zu den Mikrosphären pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 21 °C und 750 rpm, an dessen Ende die Mikrosphären wieder dreimal mit 100  $\mu$ L PBST gewaschen und resuspendiert wurden. Nach einem kurzen Aufschütteln für 3 min bei 21 °C und 1000 rpm wurden die MFI-Signale an einem FLEXMAP 3D Gerät bei folgenden Einstellungen gemessen: Probenvolumen = 80  $\mu$ L, Zeitlimit pro well: 60 sec, Bead-Zahl: 50 Beads / ID, Standard PMT.

### recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 (Mikrogen)

Der recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 ist ein kommerziell erhältlicher multiplexer Immunoassay zum Nachweis Borrelien-spezifischer IgG- oder IgM-Antikörper der Firma Mikrogen (München, DE). Nach Absprache mit Mikrogen wurde der Assay am NMI auf der FLEXMAP 3D Plattform verwendet.

Als erstes wurde die mitgelieferte Assayplatte mit 50  $\mu$ L Wasch- und Verdünnungspuffer äquilibriert und die zu messende Probe 1:51-fach verdünnt. 50  $\mu$ L der verdünnten Probe wurden dann zusammen mit 50  $\mu$ L einer Mikropartikel-Suspension bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in einem Plattenschüttler (ThermoMixer C) zunächst für 1 min bei 600 rpm,

anschließend für 19 min bei 0 rpm. Nach der Inkubation wurde fünfmal mit 200  $\mu$ L Wasch- und Verdünnungspuffer gewaschen. Dafür wurde der Mikroplatten-Washer MultiFlo FX verwendet. Danach wurden 50  $\mu$ L Konjugat-Lösung (anti-human IgG oder anti-human IgM) pro well zugegeben und die Platte erneut zunächst für 1 min und dann für 19 min, wie bereits zuvor beschrieben, inkubiert. Darauf folgte ein letzter Waschschrift und die Mikropartikel wurden in 100  $\mu$ L Sheath Fluid resuspendiert. Vor der Messung wurden die Mikropartikel nochmals für 1 min bei 600 rpm aufgeschüttelt. Es wurden ein von Mikrogen vorab eingestelltes Messprotokoll verwendet.

### 3.2.8 Datenanalyse

#### Korrelationsanalyse nach Spearman

Die Korrelationsanalyse nach Spearman wurde verwendet, um Daten aus unterschiedlichen Messungen zu vergleichen. Als Maß für die Korrelation wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman  $r$ ) berechnet. Es handelt sich dabei um ein nicht parametrisches Maß für die statistische Abhängigkeit zwischen zwei Variablen. Im Gegensatz zur Analyse nach Pearson müssen die Daten nicht normalverteilt sein. Es können sowohl ordinal- als auch kardinalskalierte Daten analysiert werden. Die Werte des Korrelationskoeffizienten können zwischen -1 und +1 liegen. Je näher der Wert bei 0 ist, umso geringer ist der Zusammenhang zwischen den Variablen. Ein Wert  $> 0$  steht für einen positiven Zusammenhang. Bei einem Wert  $< 0$  liegt ein negativer Zusammenhang vor. Neben dem Korrelationskoeffizienten wird auch ein p-Wert berechnet. Dieser gibt an, ob sich der Korrelationskoeffizient signifikant von 0 unterscheidet. Der p-Wert wird 2-seitig (two-tailed) berechnet. Bei einem p-Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Für die Korrelationsanalysen nach Spearman wurde GraphPad Prism 9.3.1. verwendet.

#### ROC-Analyse

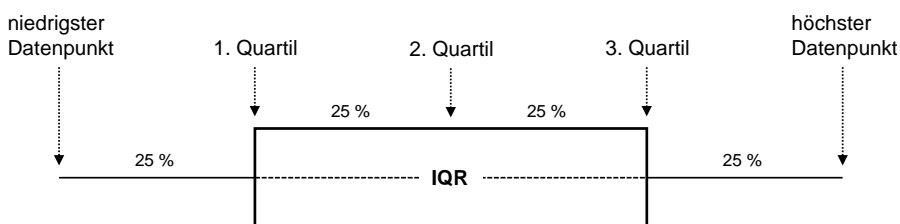
Die ROC (Receiver Operating Characteristic) Analyse gibt einen Überblick über die diagnostische Qualität eines Tests. Dabei wird die Sensitivität und Spezifität des Tests bei unterschiedlichen Grenzwerten (cut offs) berechnet und die richtig-positiv Rate (Sensitivität %) gegen die falsch-positiv-Rate ( $100\% - \text{Spezifität}\%$ ) aufgetragen. Die Fläche unterhalb der erhaltenen Kurve (area under the curve, AUC) ist ein Maß für die Qualität der Klassifizierung und kann als Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, dass eine korrekte Klassifizierung vorliegt und der Test zuverlässige Ergebnisse liefert. Der AUC-Wert kann zwischen 0,5 und 1,0 liegen, wobei es sich bei einem Wert von 0,5 um eine zufällige Klassifizierung handelt. Diese entspricht in der grafischen Darstellung einer Diagonalen. Liegt die ROC Kurve oberhalb der Diagonalen, spricht dies gegen eine zufällige Klassifizierung. Eine Kurve unterhalb der

Diagonalen gilt als nicht aussagekräftig. Für die ROC-Analysen wurde GraphPad Prism 9.3.1 verwendet.

### Ermittlung von Ausreißern

Für die Ermittlung von Ausreißern in einem Datensatz wurde der Interquartilabstand (interquartile range, IQR) verwendet. Er berechnet sich aus der Differenz zwischen dem 3. und 1. Quartil und umfasst 50 % aller Daten. Quartile sind Werte, die einen Datensatz in Viertel unterteilen (Abbildung 3-3). 25 % aller Daten liegen unterhalb des 1. Quartils (Q1). Das 2. Quartil, auch als Median bezeichnet, teilt den Datensatz in zwei gleich große Hälften. 50 % der Daten liegen unterhalb und 50 % oberhalb des 2. Quartils. Das 3. Quartil (Q3) entspricht dem Wert, über dem 25 % der Daten liegen. Die Ermittlung von Ausreißern erfolgte mit Microsoft Excel 2016. Ausreißer wurden wie folgt definiert:

- unterer Ausreißer:  $< Q1 - 1,5 \times IQR$
- oberer Ausreißer:  $> Q3 + 1,5 \times IQR$



**Abbildung 3-3: Unterteilung eines Datensatzes durch Quartile.**

Ein Datensatz wird durch Quartile in Viertel unterteilt. 25 % aller Werte sind kleiner als das 1. Quartil und 75 % kleiner als das 3. Quartil. Das 2. Quartil entspricht dem Median. 50 % der Daten liegen unterhalb und 50 % oberhalb des 2. Quartils.

### Box-Whisker-Plots

Box-Whisker-Plots dienen zur grafischen Darstellung der Verteilung von kardinalskalierten Daten. Sie bestehen aus einer Box und zwei Antennen (Whiskers), welche die Box nach unten und oben verlängern. Die Box wird durch das 1. und 3. Quartil begrenzt und umfasst die mittleren 50 % der Daten. Die Länge der Box ist ein Maß für die Streuung der Daten. Der Median ist innerhalb der Box als Linie eingezeichnet. Die Antennen können unterschiedliche Werte darstellen. In dieser Arbeit geben sie das 1. Quartil minus den 1,5-fachen IQR (untere Antenne) bzw. das 3. Quartil plus den 1,5-fachen IQR (obere Antenne) an. Werte außerhalb der Antennen werden als einzelne Punkte dargestellt. Für die Erstellung der Box-Whisker-Plots wurde GraphPad Prism 9.3.1. verwendet.

### Mann-Whitney Test

Der Mann-Whitney Test ist ein nichtparametrischer Test, bei dem die Verteilung der Werte von zwei unabhängigen Gruppen miteinander verglichen wird. Dabei werden zunächst alle Werte

unabhängig von ihrer Gruppe nach ihrer Größe sortiert und jedem Wert wird ein Rang zugeordnet, wobei der niedrigste Wert den Rang 1 erhält. Der höchste Wert bekommt den Rang n, welcher der Anzahl an Werten entspricht. Die Werte und die dazugehörigen Ränge werden dann wieder ihrer Gruppe zugeteilt und für jede Gruppe wird ein Mittelwert aus den Rängen berechnet. Die Signifikanz zwischen den berechneten Mittelwerten wird über den p-Wert bestimmt. Dieser wird mit dem Signifikanzniveau  $\alpha$  verglichen. Ist der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau, liegt eine statistische Signifikanz vor. Der Mann-Whitney Test wurde mit GraphPad Prism 9.3.1 durchgeführt. Der p-Wert wurde 2-seitig (two-tailed) berechnet. Signifikanzen wurden wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### Berechnung von Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität und Spezifität eines Assays wird berechnet, um dessen Genauigkeit zu bestimmen. Die Sensitivität gibt an, wie viel Prozent der positiven Proben im Test richtig klassifiziert wurden. Sie wird mit der Formel 1 berechnet. Die Spezifität dagegen zeigt, wie viel Prozent der negativen Proben korrekt klassifiziert wurden. Hierfür wird die Formel 2 verwendet.

$$\text{Formel 1: Sensitivität \%} = \frac{n_{\text{richtig-positiv}}}{n_{\text{gesamt-positiv}}} \times 100$$

$$\text{Formel 2: Spezifität \%} = \frac{n_{\text{richtig-negativ}}}{n_{\text{gesamt-negativ}}} \times 100$$

### PPV und NPV

Der PPV (positive predictive value, positiver Vorhersagewert) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein im Test positiv klassifizierter Patient wirklich erkrankt ist. Er berechnet sich mit der Formel 3. Der NPV (negative predictive value, negativer Vorhersagewert) dagegen gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein negativ klassifizierter Patient auch wirklich nicht erkrankt ist. Die Berechnung erfolgt mit der Formel 4.

$$\text{Formel 3: PPV \%} = \frac{n_{\text{richtig-positiv klassifiziert}}}{n_{\text{gesamt-positiv klassifiziert}}} \times 100$$

$$\text{Formel 4: NPV \%} = \frac{n_{\text{richtig-negativ klassifiziert}}}{n_{\text{gesamt-negativ klassifiziert}}} \times 100$$

### Cohen's Kapp Koeffizient

Der Cohen's Kappa Koeffizient ist ein Maß für die Übereinstimmung zweier abhängiger kategorialer Stichproben. Er wurde verwendet um zu ermitteln, wie gut das Ergebnis des Borrelia multiplex mit dem Ergebnis eines kommerziellen Tests übereinstimmt. Er wurde mit

dem frei zugänglichen Programm „GraphPad QuickCalc“<sup>93</sup> berechnet. Bei einem Wert > 0,8 liegt eine nahezu vollständige Übereinstimmung vor.

### Fisher's Exact Test

Der Fisher's Exact Test wird verwendet, um festzustellen, ob zwischen zwei kategorialen Variablen ein signifikanter Unterschied besteht. Im Gegensatz zum Chi-Quadrat Test ist er auch bei einer geringen Stichprobengröße anwendbar. Wie auch bei dem Mann-Whitney Test wird die Signifikanz über den p-Wert bestimmt. Ist der p-Wert kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau, kann von einem signifikanten Unterschied zwischen den Variablen ausgegangen werden. Für den Fisher's Exact Test wurde GraphPad Prism 9.3.1 verwendet. Der p-Wert wurde 2-seitig (two-tailed) berechnet. Signifikanzen wurden wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### AI-Berechnung nach Reiber

Um festzustellen, ob im CSF nachgewiesenen Borrelien-spezifischen Antikörper intrathekal gebildet wurden, wurde der Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex (AI) berechnet. Die Berechnung erfolgte wie im Folgenden beschrieben nach der Reiber-Methode<sup>94</sup>.

Bei dieser Methode wird zunächst ein so genanntes Reiber-Diagramm erstellt, um zu beurteilen, ob eine generelle intrathekale Antikörpersynthese und/oder eine Blut-Liquor-Schrankenstörung vorliegen. Wird eine Schrankenstörung bei der AI-Berechnung nicht berücksichtigt, kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Für die Erstellung des Reiber-Diagramms werden die Konzentrationen von Albumin und Gesamt-IgG bzw. Gesamt-IgM im CSF und Serum sowie das Alter des Patienten benötigt. Aus den Konzentrationen wird jeweils der CSF/Serum-Quotient ( $Q_{Alb}$ ,  $Q_{IgG}$ ,  $Q_{IgM}$ ) berechnet. Über den  $Q_{IgG}$  bzw.  $Q_{IgM}$  wird weiter der Antikörper-spezifische  $Q_{Lim}$  sowie der  $Q_{Low}$  berechnet (Formel 5). Der  $Q_{Lim}$  dient als Diskriminierungslinie zur Abgrenzung einer intrathekalen Antikörpersynthese. Um eine Störung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion nachzuweisen, wird zusätzlich die Grenze für den  $Q_{Alb}$  benötigt. Diese ist altersabhängig und wird mit der Formel 6 berechnet. Bei einer intrathekalen Antikörpersynthese wird auch die intrathekale Fraktion (IF, Formel 7) berechnet. Sie gibt an, wie viel Prozent der gesamten Liquorkonzentration intrathekal synthetisiert wurde.

**Formel 5:**  $Q_{Lim} = a/b \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$

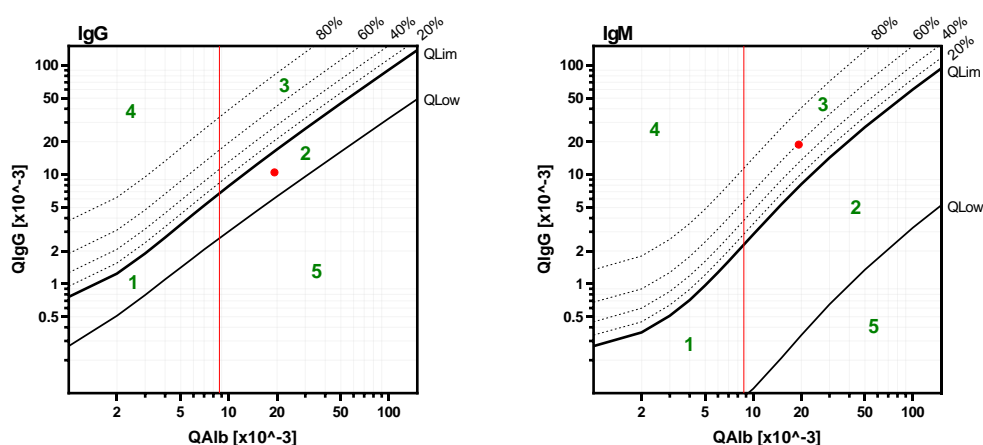
		a/b	b <sup>2</sup> x 10 <sup>6</sup>	c x 10 <sup>3</sup>
IgG	$Q_{Lim}$	0,93	6	1,7
	$Q_{Low}$	0,33	2	0,3
IgM	$Q_{Lim}$	0,67	120	7,1
	$Q_{Low}$	0,04	442	0,82



**Formel 6:** Grenze  $Q_{Alb} = (4 + \text{Alter}/15) \times 10^{-3}$

**Formel 7:**  $IF = \left(1 - \frac{Q_{Lim}}{Q_{IgG/IgM}}\right) \times 100$

Eine beispielhaftes Reiber-Diagramm für IgG- bzw. IgM-Antikörper ist in der Abbildung 3-4 gezeigt. Es wird der  $Q_{Alb}$  gegen den  $Q_{IgG/IgM}$  aufgetragen (roter Punkt). Die altersabhängige Grenze für den  $Q_{Alb}$  ist als rote Linie eingezeichnet.



**Abbildung 3-4: Beispielhaftes Reiber-Diagramm für IgG- bzw. IgM-Antikörper.**

Das Reiber-Diagramm wird auf Grundlage der Albumin-Konzentration sowie der IgG- bzw. IgM-Konzentration im CSF und Serum erstellt. Es wird der  $Q_{Alb}$  gegen den  $Q_{IgG/IgM}$  aufgetragen (roter Punkt). Zudem wird die altersabhängige Grenze für den  $Q_{Alb}$  (rote Linie) eingezeichnet. Das Diagramm lässt sich in fünf Bereiche unterteilen: 1) normale Werte, 2) reine Liquor/Serum-Schrankenstörung, 3) intrathekale Antikörpersynthese mit Blut-Liquor-Schrankenstörung, 4) intrathekale Antikörpersynthese ohne Blut/Liquor-Schrankenstörung, 5) methodischer Messfehler. [erstellt nach Uhr & Reiber (2020)<sup>94</sup>]

Das Diagramm lässt sich in fünf Bereiche unterteilen. Im Bereich 1 liegt keine Störung der Blut-Liquor-Schranke vor und es werden keine intrathekalen Antikörper gebildet. Im Bereich 2 werden ebenfalls keine intrathekalen Antikörper gebildet, es liegt jedoch eine Störung der Blut-Liquor-Schranke vor. Im Bereich 3 gibt es eine intrathekale Antikörpersynthese bei einer gleichzeitigen Blut-Liquor-Schrankenstörung. Im Bereich 4 findet ebenfalls eine intrathekale Antikörpersynthese statt, hier jedoch ohne Blut-Liquor-Schrankenstörung. Bei Werten im Bereich 5 liegt ein methodischer Messfehler vor.

Nach der Erstellung und Auswertung des Reiber-Diagramms erfolgt die Berechnung des Borrelien-spezifischen AI. Dafür wird unter anderem der bereits für das Reiber-Diagramm berechnete  $Q_{IgG}$  oder  $Q_{IgM}$  bzw. der  $Q_{Lim}$  benötigt. Zudem werden die bei der Probenklassifizierung berechneten S/CO-Werte verwendet. Der AI wird zunächst für jedes Antigen einzeln berechnet, wobei eine Berechnung nur bei Antigenen mit einem S/CO-Wert  $\geq 0,75$  (CSF) bzw.  $\geq 0,50$  (Serum) vorgenommen wird. Aus den S/CO-Werten und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor wird der spezifische IgG- bzw. IgM-Quotient mit der

Formel 8 berechnet. Über die Reiber-Formel wird dann der AI berechnet. Liegt laut Reiber-Diagramm keine intrathekale Antikörpersynthese vor, wird zur Berechnung der  $Q_{\text{IgG}}$  oder  $Q_{\text{IgM}}$  verwendet (Formel 9). Bei einer vorliegenden intrathekalen Synthese wird statt dem  $Q_{\text{IgG/IgM}}$  der  $Q_{\text{Lim}}$  eingesetzt. Dabei handelt es sich um den empirischen Grenzwert für die maximal aus dem Serum stammende IgG-Fraktion. Er ist abhängig vom Albumquotienten. Aus den für die einzelnen Antigene berechneten AI wird final ein Mittelwert berechnet. Bei einem AI > 1,5 kann von einer Borrelien-spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese ausgegangen werden<sup>95</sup>.

**Formel 8:** 
$$Q_{\text{spez.}} = \frac{(S/CO \times \text{Verdünnungsfaktor})_{\text{CSF}}}{(S/CO \times \text{Verdünnungsfaktor})_{\text{Serum}}}$$

**Formel 9:** 
$$AI = \frac{Q_{\text{spez.}}}{Q_{\text{IgG/IgM}}} \quad \text{bzw.} \quad AI = \frac{Q_{\text{spez.}}}{Q_{\text{Lim}}}$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswahl der *Borrelia*-Antigene

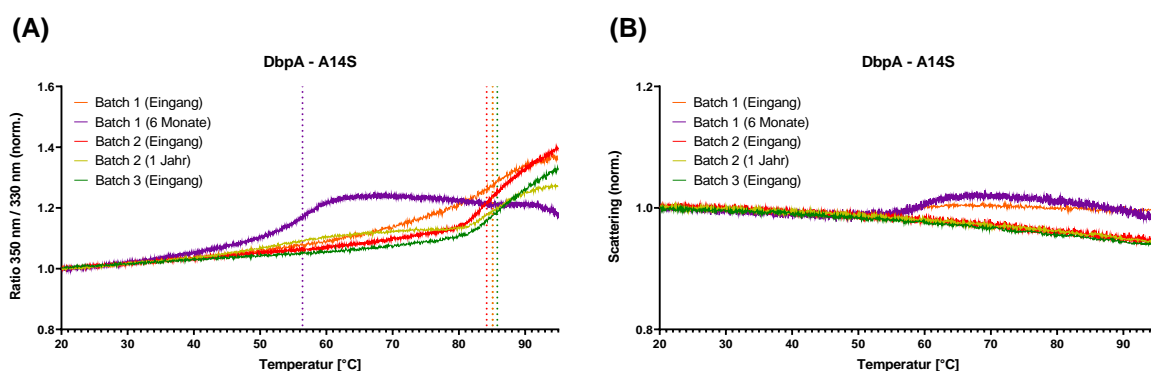
Zu Beginn des Projekts wurden acht *Borrelia*-Antigene (BmpA, DbpA, OppA-2, OspA, OspC, p41, p83/100 und VlsE) für den Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper in Betracht gezogen. Die Auswahl der Antigene erfolgte nach einer vorangegangenen Literaturrecherche zu auf dem Markt befindlichen Borreliose-Tests. Es handelt sich um Antigene der frühen und späten Infektionsphase, die vor allem eine IgG- oder IgM-Immunantwort auslösen. Da sich die Antigene zwischen den verschiedenen Borrelien-Arten in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden können, musste zunächst ermittelt werden, bei welchen Antigenen eine Berücksichtigung der Art notwendig ist. Dafür wurde basierend auf Sequenzen der UniProt-Datenbank ein Sequenzalignment erstellt. Das Ergebnis ist in der Tabelle 4-1 gezeigt. Die verwendeten UniProt-Sequenzen sind im Anhang zu finden. Bei den ermittelten Übereinstimmungen (%) handelte es sich jedoch lediglich um ungefähre Werte, da manche Sequenzen nicht vollständig waren und zu manchen Arten zum Teil verschiedene Aminosäuresequenzen vorlagen. Basierend auf dem Ergebnis wurden die Antigene DbpA und OspC, welche eine deutliche Heterogenität aufwiesen, von allen fünf humanpathogenen Arten in Europa hergestellt. Für das ebenfalls sehr heterogene Antigen VlsE wurde nur die Art *B. burgdorferi* s.s. ausgewählt. Eine Produktion des Antigens von verschiedenen Arten erschien hier nicht notwendig, da bei diesem Antigen eine konservierte immundominante Region (IR6, C6-Peptid)<sup>51,96</sup> bekannt ist. Auch für die anderen Antigene wurde nur eine Art ausgewählt, da ihre Heterogenität als gering eingeschätzt wurde. Die Wahl der Art lag bei der tgcBIOMICS GmbH. Von dem Antigen p41 wurde lediglich ein internes Fragment (p41i) verwendet, da dieses als weniger kreuzreaktiv gegenüber anderen Pathogenen gilt<sup>34</sup>. Eine Übersicht über die produzierten Antigene befindet sich in 3.1.1 Antigene / Peptide. Der Lagerungspuffer der Antigene wurde basierend auf den zu den UniProt-Sequenzen ermittelten isoelektrischen Punkten und Titrationskurven (Verwendung des frei zugänglichen Programms „Prot pi“<sup>97</sup>) gewählt. Für eine bessere Löslichkeit der Antigene, sollte der Puffer einen pH-Wert besitzen, der nicht dem isoelektrischen Punkt des Antigens entsprach. Zudem musste bei der Pufferauswahl darauf geachtet werden, dass keine Amine (z.B. Tris) enthalten waren. Diese hätten bei der späteren Immobilisierung der Antigene Probleme bereitet, da die Amine im Puffer mit der primären Aminogruppe des Antigens konkurriert und somit die Carboxylgruppen der Mikrosphären blockiert hätten (siehe 3.2.3 Immobilisierung von Proteinen an MagPlex Mikrosphären). Final wurden zwei Puffer für die Lagerung der Antigene verwendet - ein MES-Puffer mit 150 mM NaCl (pH 5,5) und ein PBS-Puffer ohne weitere Zusätze (pH 7,4).

**Tabelle 4-1: Sequenzalignment für die Antigene der einzelnen Borrelien-Arten.**

Für das Sequenzalignment wurden Sequenzen aus der UniProt-Datenbank verwendet. Da die Sequenzen zum Teil nicht vollständig waren oder es zu einer Art mehrere Sequenzen gab, dienten die berechnete Übereinstimmung (%) lediglich als Anhaltspunkt. Vor allem bei den Antigenen DbpA und VisE lag eine hohe Heterogenität vor. Die Antigene OppA-2 und p41 dagegen besaßen stark homogene Sequenzen. rot  $\hat{=}$  hohe Heterogenität, grün  $\hat{=}$  geringe Heterogenität

vorherrschende Antikörperantwort	Infektionsphase		BmpA		DbpA		OppA-2		OspA		OspC		p41		p83/100		VisE	
	früh / spät	IgG	früh / spät	IgG	spät	IgG	spät	IgG	spät	IgG	früh	IgM	früh	IgM	spät	IgG	früh	IgG
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	87,6 %		36,8 %		92,0 %		81,3 %		66,8 %		98,8 %		98,4 %		35,6 %			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	88,5 %		32,1 %		92,0 %		77,3 %		78,3 %		96,7 %		86,3 %		44,9 %			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	86,1 %		36,2 %		91,1 %		83,2 %		74,2 %		97,6 %		83,3 %		45,0 %			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	87,9 %		36,8 %		91,9 %		80,2 %		70,0 %		98,2 %		98,4 %		41,8 %			
<i>B. garinii</i>	89,7 %		44,0 %		92,2 %		82,4 %		75,3 %		96,7 %		86,6 %		32,8 %			
<i>B. garinii</i>	87,9 %		50,6 %		91,3 %		83,5 %		76,4 %		98,2 %		83,6 %		32,7 %			
<i>B. garinii</i>	92,9 %		63,4 %		92,8 %		89,0 %		73,0 %		98,8 %		100,0 %		29,2 %			
<i>B. afzelii</i>	95,0 %		52,9 %		93,5 %		85,3 %		76,1 %		96,7 %		87,5 %		45,2 %			
<i>B. afzelii</i>	89,7 %		46,3 %		96,8 %		83,2 %		74,1 %		96,4 %		86,6 %		57,0 %			
<i>B. spielmanii</i>	88,2 %		53,1 %		93,9 %		83,9 %		74,9 %		97,6 %		83,6 %		44,6 %			
<b>durchschnittliche Übereinstimmung</b>	<b>89,4 %</b>		<b>45,2 %</b>		<b>92,8 %</b>		<b>82,9 %</b>		<b>73,9 %</b>		<b>97,8 %</b>		<b>89,4 %</b>		<b>40,9 %</b>			

Alle hergestellten Antigene wurde nach Erhalt mit dem Prometheus NT.48 auf ihre thermische Stabilität und ihr Aggregationsverhalten untersucht. Da Veränderungen in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten auf einen Funktionsverlust der Antigene hinweisen können, wurden die Analysen in regelmäßigen Abständen wiederholt. In der Abbildung 4-1 sind als Beispiel die Proteinanalysen des DbpA - A14S gezeigt. Die Analysen zu den anderen Antigenen befinden sich im Anhang (Abbildung 7-2 bis Abbildung 7-16).



Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	0,98 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	85,1 ± 0,54	-	*
		Batch 1 (6 Monate) <sup>T</sup>	56,4 ± 0,37	-	*
PBS + 0,5 % Trehalose pH 7,4	2,00 mg/mL	Batch 2 (Eingang) <sup>T</sup>	84,2 ± 0,09	-	-
		Batch 2 (1 Jahr) <sup>D</sup>	85,1 ± 0,24	-	-
		Batch 3 (Eingang) <sup>D</sup>	85,8 ± 0,43	-	-

(\*) nicht berechenbar (-) nicht vorhanden

#### Abbildung 4-1: Proteinanalyse des Antigens DbpA - A14S.

Die thermische Stabilität (A) und das Aggregationsverhalten (B) wurden mit dem Prometheus NT.48 untersucht. Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (orange) eine Tm von  $85,1 \pm 0,54$  °C. Es konnte eine leichte Aggregation festgestellt werden, eine Berechnung der Aggregationstemperatur war jedoch nicht möglich. Nach sechs Monaten (lila) war ein Verlust der thermischen Stabilität zu beobachten. Bei einer zweiten Batch (rot) mit anderem Lagerungspuffer konnte die gleiche Schmelztemperatur berechnet werden wie bei der Eingangsanalyse der ersten Batch. Es lag jedoch keine Aggregation mehr vor. Eine Veränderung der thermischen Stabilität oder des Aggregationsverhalten konnte nach einem Jahr (gelb) nicht festgestellt werden. Eine dritte Batch (grün) bestätigte die stabile Produktion des Antigens. Die Analysen erfolgten in Triplikaten (T) oder Duplikaten (D).

Die Antigene DbpA - A14S, p41i - PKo und p83/100 - PKo wurden bereits nach sechs Monaten erneut untersucht, nachdem diese nicht reproduzierbar immobilisiert werden konnten. Bei dem Antigen DbpA - A14S konnte ein deutlicher Verlust der thermischen Stabilität festgestellt werden. Die Schmelztemperatur (Tm) sank um etwa 30 °C von  $85,1 \pm 0,54$  °C auf  $56,4 \pm 0,37$  °C. Das Aggregationsverhalten schien sich ebenfalls geringfügig verändert zu haben, wobei die Software zu keinem Zeitpunkt eine Aggregationstemperatur (Tagg) berechnen konnte. Bei dem Antigen p83/100 - PKo dagegen konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch eine geringe Aggregation, welche bei Erhalt des Antigens noch nicht zu erkennen war. Allerdings konnte auch hier keine

Aggregationstemperatur berechnet werden. Bei dem Antigen p41i - PKo wurde ebenfalls eine geringe Veränderung in der thermischen Stabilität festgestellt. Eine Aggregation des Antigens lag nicht vor. Auf Grund der Ergebnisse wurde beschlossen, die Antigene DbpA - A14S und p83/100 - PKo noch einmal zu produzieren. Um eine bessere Stabilität zu gewährleisten wurde der Lagerungspuffer geändert. Für beide Antigene wurde ein PBS-Puffer (pH 7,4) mit 5 % Trehalose gewählt. Eine Analyse der zweiten Batch lieferte vergleichbare Ergebnisse zur Eingangsanalyse der ersten Batch und auch nach einem Jahr konnten keine größeren Veränderungen in der thermischen Stabilität festgestellt werden. Eine Aggregation konnte bei der zweiten Batch von DbpA - A14S nicht mehr beobachtet werden. Bei p83/100 - PKo kam es nach einem Jahr zu einer geringen Aggregation. Eine Aggregationstemperatur konnte nicht berechnet werden. Mit einer dritten Batch konnte die stabile Produktion der Antigene bestätigt werden. Von dem Antigen p41i - PKo wurde keine weitere Batch hergestellt, da sich die Expression und Aufreinigung des Antigens als schwierig erwies und auch die MFI-Signale im Assay sehr niedrig waren.

Als Alternative zu den Antigenen wurde ein Einsatz von Peptiden überlegt. Es sollten das Antigen VlsE - B31 sowie die verschiedenen OspC-Antigene ersetzt werden. An Stelle des VlsE sollte ein Peptid mit der Sequenz der immundominanten Region IR6 (C6-Peptid) synthetisiert werden. Für das OspC sollte ebenfalls die Sequenz einer bekannten immundominanten Region (C10-Peptid) verwendet werden. Die Synthese der Peptide wurde bei der Firma Intavis in Auftrag gegeben. Für jedes Antigen wurden zwei Peptide mit unterschiedlichen Linkern (Cys-Doa-Doa und Biotin-Ttds) bestellt. Die Peptide wurden nach Erhalt auf Mikrosphären immobilisiert (siehe 3.2.4 Immobilisierung von Peptiden an MagPlex Mikrosphären) und in einem ersten Versuch mit den Vollängen-Antigenen verglichen (Tabelle 4-2 - VlsE), Tabelle 4-3 - OspC). Dafür wurden fünf Serum-Proben von Central BioHub mit einer finalen Verdünnung von 1:800 in Einfachbestimmungen gemessen. Vier Proben (Serum 1-4) stammten von gesunden Spendern. Eine fünfte Probe (Serum 5) war Borreliose-positiv. Als Assaypuffer wurde CBST verwendet. Die erhaltenen MFI-Signale waren für die beiden VlsE-Peptide vergleichbar, wobei das Hintergrundsignal (blank) des Biotin-Ttds-VlsE doppelt so hoch war wie das Signal des Cys-Doa-Doa-VlsE. Im Vergleich zu den Signalen des VlsE-Antigens zeigte sich dagegen zum Teil ein deutlicher Unterschied. Die OspC-Peptide unterschieden sich in ihren MFI-Signalen deutlicher voneinander. Vor allem für das Peptide Cys-Doa-Doa-OspC waren die MFI-Signale relativ hoch. Im Vergleich zu den verschiedenen OspC-Antigenen schienen die Signale beider Peptide ebenfalls leicht erhöht. Bei einer Verwendung der OspC-Peptide im *Borrelia neuroplex* (CSF-Proben, Borreliose-positiv, Central Bio Hub) zeigte sich zudem bei dem Peptid Biotin-Ttds-OspC eine Kreuzreaktion zwischen dem Biotin des Linkers und dem für die CXCL13-Detektion benötigten PE-konjugierten Streptavidin. Dadurch kam es zu falsch-positiven Signalen. Auch hier wurde

in Einfachbestimmungen gemessen. Bei dem Peptid Biotin-Ttds-VlsE konnte diese Kreuzreaktion nicht beobachtet werden, da die Detektion des IgG separat von der IgM- und CXCL13-Detektion erfolgte und somit kein PE-konjugiertes Streptavidin verwendet wurde. Letztendlich wurde auf den Einsatz der Peptide im Assay verzichtet.

**Tabelle 4-2: Vergleich des Antigens VlsE - B31 mit synthetisierten VlsE-Peptiden.**

Für den Vergleich des Antigens VlsE - B31 mit den synthetisierten VlsE-Peptiden wurden fünf Serum-Proben von Central BioHub verwendet. Die finale Probenverdünnung lag bei 1:800. Vier Proben (Serum 1 - 4) stammten von gesunden Spendern. Eine Probe (Serum 5) war Borreliose-positiv. Als Assaypuffer wurde CBST verwendet. Es wurden Einfachbestimmungen gemessen. Gezeigt sind die MFI-Signale der IgG-Detektion.

Probe	VlsE - B31	Cys-Doa-Doa-VlsE	Biotin-Ttds-VlsE
Serum 1	311	295	340
Serum 2	20.349	25.545	22.321
Serum 3	291	88	105
Serum 4	178	127	116
Serum 5	12.575	27.411	22.970
blank	25	16	32

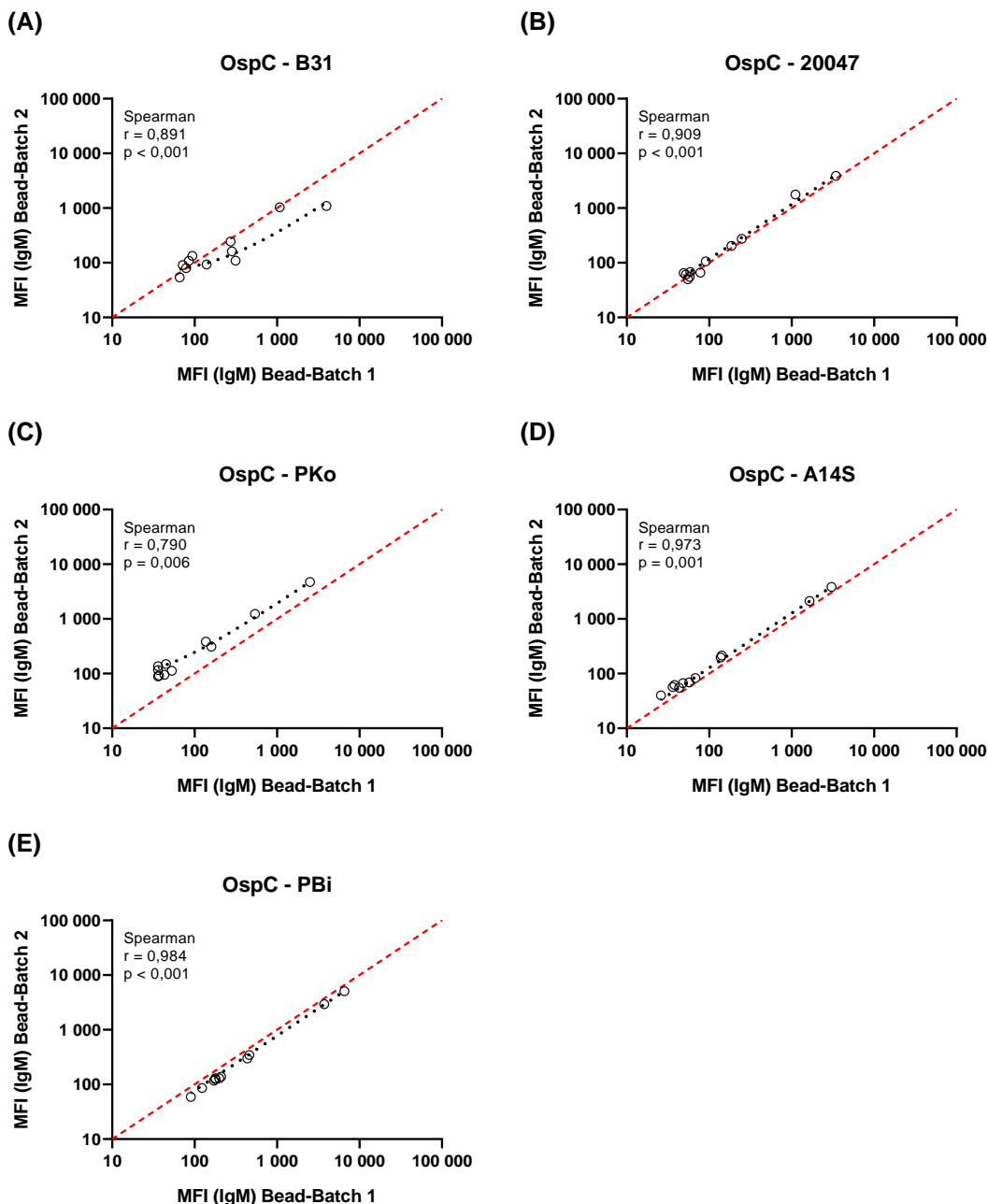
**Tabelle 4-3: Vergleich der verschiedenen OspC-Antigene mit synthetisierten OspC-Peptiden.**

Bei einem ersten Vergleich der verschiedenen OspC-Antigene mit den synthetisierten Peptiden wurden fünf Serum-Proben von Central BioHub bei einer finalen Verdünnung von 1:800 verwendet. Vier Proben (Serum 1 - 4) stammten von gesunden Spendern. Eine Probe (Serum 5) war Borreliose-positiv. Als Assaypuffer diente CBST. Die in Einfachbestimmungen gemessenen MFI-Signale unterschieden sich zum Teil deutlich voneinander. In einem zweiten Versuch wurden die Antigene und Peptide im *Borrelia neuroplex* verwendet. Es wurden CSF-Proben (Borreliose-positiv, Central BioHub) mit einer finalen Verdünnung von 1:10 gemessen. Gezeigt sind die MFI-Signale der IgM-Detektion.

Probe	OspC - B31	OspC - 20047	OspC - PKo	OspC - A14S	OspC - PBi	Cys-Doa-Doa-OspC	Biotin-Ttds-OspC
Serum 1	218	48	47	66	196	803	198
Serum 2	85	49	51	42	94	176	218
Serum 3	303	209	190	140	374	590	459
Serum 4	115	72	92	51	198	651	264
Serum 5	4.556	3.281	3.157	10.074	13.407	10.258	6.556
blank	23	23	11	14	32	24	20
CSF 7	82	84	54	70	152	167	38.369
CSF 8	22	24	10	16	33	33	38.931
blank	23	24	12	15	35	29	38.648

Bei der Auswahl der *Borrelia*-Antigene wurde auch die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung betrachtet. Dafür wurden die MFI-Signale der Antigene aus zwei Immobilisierungen (Bead-Batch 1 und 2) mit einer Korrelationsanalyse nach Spearman verglichen. Für den Vergleich wurden sieben Borreliose-negative und vier Borreliose-positive Seren von Central

BioHub in Einfachbestimmungen mit dem Borrelia multiplex gemessen. Die Analysen zu den verschiedenen OspC-Antigenen sind in der Abbildung 4-2 gezeigt, die Analysen für die anderen Antigene befinden sich im Anhang (Abbildung 7-17 und Abbildung 7-18).



**Abbildung 4-2: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - I.**

Um die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung zu untersuchen, wurden sieben Borreliose-negative und vier Borreliose-positive Seren von Central BioHub in Einfachbestimmungen mit dem Borrelia multiplex gemessen. Für die IgM-dominanten OspC-Antigene wurden die MFI-Signale der IgM-Detektion betrachtet. Die Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.



Bei den Antigenen DbpA - ZS7, DbpA - A14S, DbpA - PBi, OppA-2 - PBi, OspA - PKo, OspC - 20047, OspC - A14S, OspC - PBi und VlsE - B31 lag eine sehr starke Korrelation zwischen den MFI-Signalen ( $r > 0,900$ ) beider Bead-Batches vor. Eine ebenfalls starke Korrelation ( $r > 0,700$ ) konnte bei den Antigenen BmpA - PKo, DbpA - 20047, DbpA - PKo, OspC - B31 und OspC - PKo festgestellt werden. Bei dem Antigen p83/100 - PKo war eher eine schwache Korrelation zwischen den MFI-Signalen ( $r > 0,400$ ) vorhanden.

Basierend auf den Ergebnissen der Proteinanalysen und der Korrelationsanalysen zur Reproduzierbarkeit der Immobilisierung wurden für das finale Antigen-Panel sechs Antigene ausgewählt. Das Antigen DbpA sollte weiterhin von allen Arten verwendet werden, da bei diesem Antigen im Assay die Antikörperantwort stark von der Borrelien-Art abhängig war. Dies ist auf die hohe Heterogenität in der Aminosäuresequenz zurückzuführen. Neben dem DbpA sollten auch die Antigene BmpA (aus *B. afzelii* PKo), OppA-2 (aus *B. bavariensis* PBi), p83/100 (aus *B. afzelii* PKo) und VlsE (aus *B. burgdorferi* s.s.) als IgG-dominante Antigene eingesetzt werden. Das ebenfalls IgG-dominante OspA-Antigen wurde ausgeschlossen, da sich die MFI-Signale Borreliose-positiver Proben im Assay kaum von den Signalen Borreliose-negativer Proben unterschieden. Zur Detektion einer IgM-Antikörperantwort sollten die OspC-Antigene verwendet werden. Da für alle OspC-Antigene in der Regel eine vergleichbare Antikörperantwort detektiert wurde, sollte das OspC final nur noch von zwei Arten eingesetzt werden. Die Wahl fiel auf das OspC - 20047 und das OspC - A14S, da hier eine hohe Reproduzierbarkeit der Immobilisierung vorlag. Auch für das OspC - PBi war die Reproduzierbarkeit hoch, jedoch lieferten die Proteinanalysen mit dem Prometheus NT.48 ungenaue Schmelzkurven, was eine langfristige Kontrolle der Antigen-Stabilität erschwerte. Mit einer SDS-PAGE wurde abschließend die Reinheit der für die Assay-Validierung und das anschließende Proben-Screening verwendeten Antigen-Batches überprüft. Die Bilder der Gel-Dokumentation sind im Anhang (Abbildung 7-19) zu finden.

## **4.2 Detektion der Immunantwort bei einer Lyme-Borreliose (Borrelia multiplex)**

### **4.2.1 Assay-Entwicklung**

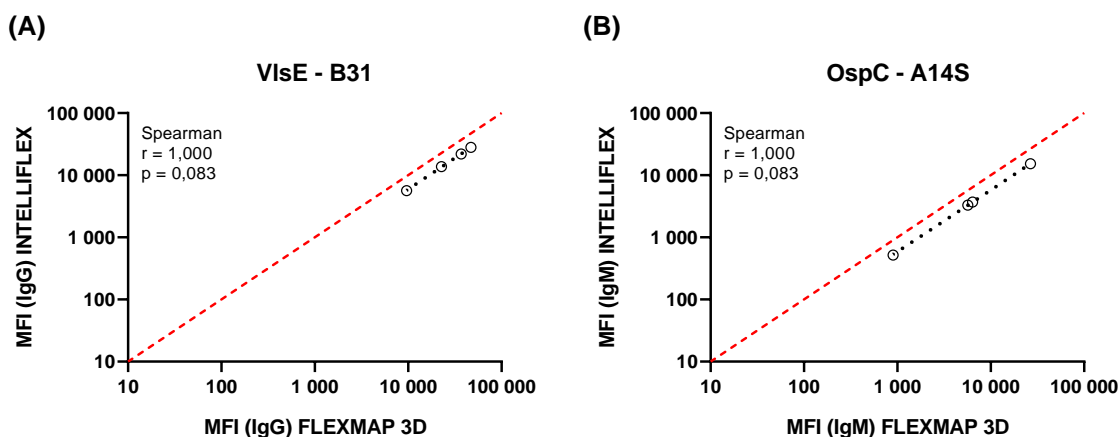
#### **Pufferauswahl und Probenverdünnung**

Für den *Borrelia multiplex* wurde ein Assaypuffer auf CBS-Basis verwendet. Um unspezifische Bindung im Assay zu verhindern, wurde der Puffer mit LCB (final 1:4 LCB/CBS) versetzt. Zudem wurden 0,05 % Tween20 hinzugefügt. Der Puffer wurde in dieser Zusammensetzung bereits für den MultiCoV-Ab<sup>98</sup> zur Detektion von Antikörpern bei einer SARS-CoV-2-Infektion verwendet.

Für die Probenmessung wurde eine finale Verdünnung von 1:400 gewählt. Diese Verdünnung wurde ebenfalls im MultiCoV-Ab<sup>98</sup> verwendet. Da es bei der Detektion von IgM Antikörpern durch Anwesenheit von Rheumafaktoren zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann, wurde eine Vorbehandlung der Proben mit einem RF-Absorbens in Erwägung gezogen. Da jedoch bei den meisten Proben eine Vorbehandlung nicht notwendig war (siehe 4.3.1 Assay-Entwicklung (*Borrelia neuroplex*)), wurde final drauf verzichtet.

### FLEXMAP 3D versus INTELLIFLEX

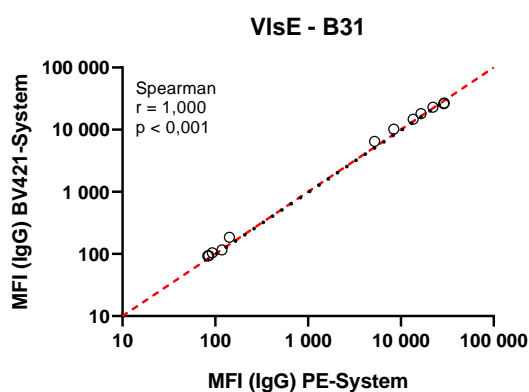
Der *Borrelia multiplex* wurde ursprünglich auf der FLEXMAP 3D Plattform entwickelt. Für den parallelen Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern musste der Assay an die INTELLIFLEX Plattform angepasst werden. In einem ersten Schritt wurden die Reporter Channel für das PE-konjugierte Detektionssystem der beiden Plattformen miteinander verglichen (Abbildung 4-3, Anhang: Abbildung 7-20 und Abbildung 7-21). Für den Vergleich wurden vier Borreliose-positive Serum-Proben verwendet. Zwei Seren stammten von Central BioHub, die anderen beiden Seren aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die Messung erfolgte in Einfachbestimmungen. Bei allen Antigenen gab es eine starke Korrelation zwischen den MFI-Signalen beider Reporter Channels. Allerdings waren die MFI-Signale der INTELLIFLEX Messung im Durchschnitt um das 1,7-fache niedriger als die Werte der FLEXMAP 3D Messung.



**Abbildung 4-3: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - I.**

Um die Reporter Channel für das PE-konjugierte Detektionssystem zu vergleichen, wurden vier Borreliose-positive Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* auf beiden Plattformen in Einfachbestimmungen gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für das IgG-dominante Antigen VisE - B31 **(A)** und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S **(B)**.

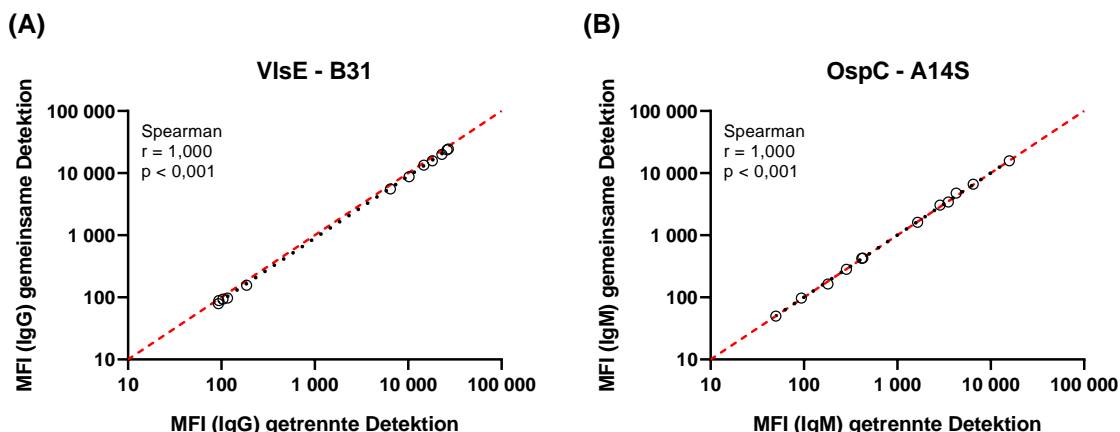
In einem zweiten Schritt wurde dann der normalerweise für die IgG-Detektion verwendete gt-a-hulgG-PE Antikörper durch einen biotinylierten gt-a-hulgG Antikörper ersetzt. Durch die zusätzliche Verwendung eines BV421-konjugierten Streptavidins konnte somit für die IgG-Detektion der zweite Reporter Channel der INTELLIFLEX genutzt werden. Ein Vergleich beider Detektionssysteme (PE und BV421) ist in der Abbildung 4-4 für VisE - B31 gezeigt. Die Vergleiche für die anderen IgG-dominanten Antigene sind in der Abbildung 7-22 und der Abbildung 7-23 im Anhang zu finden. Für den Vergleich wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* in Einfachbestimmungen gemessen. Die Proben waren von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Es lag eine starke Korrelation der MFI-Signale beider Detektionssysteme vor, so dass zukünftig für die IgG-Detektion das BV421-Detektionssystem verwendet werden konnte. Die IgM-Detektion erfolgte weiterhin mit dem PE-Detektionssystem.



**Abbildung 4-4: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - I.**

Für den Vergleich beider Detektionssysteme wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.

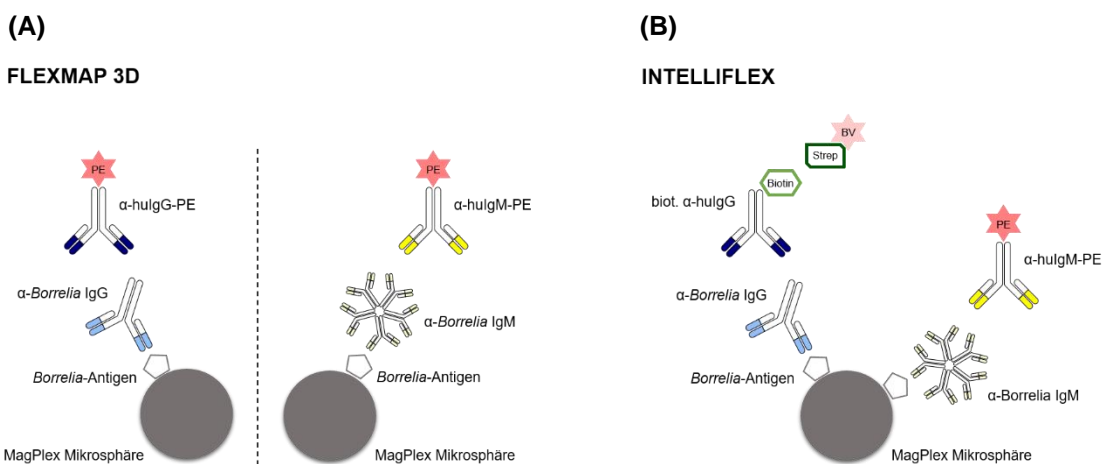
Um in einem dritten Schritt eine IgG/IgM-Kreuzreaktion bei gleichzeitiger Detektion auszuschließen, wurden die beiden Antikörperklassen in zwei verschiedenen Ansätzen einmal getrennt und einmal gemeinsam detektiert. Es wurden die gleichen Proben wie für den Vergleich der Detektionssysteme verwendet. Die Messungen mit dem *Borrelia multiplex* erfolgten in Einfachbestimmungen. Die MFI-Signale bei gemeinsamer Detektion korrelierten bei allen Antigenen stark mit den Signalen aus der getrennten Detektion (Abbildung 4-5, Anhang: Abbildung 7-24 und Abbildung 7-25). Eine IgG/IgM-Kreuzreaktion konnte damit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 4-5: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion - I.**

Für den Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem Borrelia multiplex in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für das IgG-dominante Antigen VisE - B31 (A) und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S (B).

Nach der Anpassung an die INTELLIFLEX standen für den Borrelia multiplex zwei Luminex-Plattformen zur Verfügung. In Abbildung 4-6 ist der Assay noch einmal für beide Plattformen schematisch dargestellt.



**Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Borrelia multiplex auf zwei Luminex-Plattformen.**

Der Borrelia multiplex kann sowohl auf der FLEXMAP 3D Plattform (A) als auch auf der INTELLIFLEX Plattform (B) verwendet werden. Während bei der FLEXMAP 3D Plattform beide Antikörperklassen nur getrennt mit einem PE-Detektionssystem detektiert werden können, ist bei der INTELLIFLEX Plattform eine gemeinsame Detektion über ein PE-Detektionssystem für IgM-Antikörper und ein BV421-Detektionssystem für IgG-Antikörper möglich. Bei dem PE-System werden die Antikörper direkt über einen PE-konjugierten anti-human Antikörper nachgewiesen. Bei dem BV421-System erfolgt der Nachweis über einen biotinylierten anti-human Antikörper und ein BV421-konjugiertes Streptavidin.

#### 4.2.2 technische Assay-Validierung

Die technische Validierung des Borrelia multiplex wurde in Anlehnung an die „Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA<sup>76</sup> und die „Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry“ der FDA<sup>77</sup> durchgeführt. Zur Einschätzung der Robustheit des Assays wurden zwei statistische Parameter verwendet.

- Standardabweichung (standard deviation, SD):

Die SD ist ein Maß für die Streuung der Werte um den Mittelwert. In dieser Arbeit wurde die SD mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 ermittelt. Es handelte sich um eine Schätzung ausgehend von einer Stichprobe.

- Variationskoeffizient (coefficient of variation, CV):

Der CV ist ein relatives Maß für die Streuung der Werte und berechnet sich aus dem Verhältnis von Standardabweichung zu Mittelwert. In dieser Arbeit wurde der Variationskoeffizient als Prozentwert (%CV) angegeben.

Für die Validierung wurden vier Serum-Validierungsproben verwendet. Es handelte sich um Borreliose-positive Seren von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch.

#### Detektionsgrenze (*Limit of Detection* = LOD)

**Tabelle 4-4: Detektionsgrenzen (LODs) der Antigene im Borrelia multiplex.**

Für die Bestimmung der Detektionsgrenze (LOD) wurde der Assaypuffer des Borrelia multiplex in 21 Replikaten gemessen. Für jedes Antigen wurde eine LOD aus dem Mittelwert und dreimal der Standardabweichung berechnet. Die Berechnung erfolgte sowohl für die FLEXMAP 3D als auch für die INTELLIFLEX.

Antikörper- antwort	Antigen	LOD (Mittelwert + 3x SD)	
		FLEXMAP 3D	INTELLIFLEX
IgG	VlsE - B31	29	8
	BmpA - PKo	32	10
	DbpA - ZS7	38	14
	DbpA - 20047	37	8
	DbpA - PKo	42	9
	DbpA - A14S	32	10
	DbpA - PBi	51	9
	p83/100 - PKo	33	9
	OppA-2 - PBi	31	9
IgM	OspC - 20047	28	27
	OspC - A14S	34	29

Für die Bestimmung der Detektionsgrenze (LOD) wurde der Assaypuffer des Borrelia multiplex in 21 Replikaten auf einer Assayplatte gemessen. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Der LOD wurde dann aus dem Mittelwert und dreimal der Standardabweichung berechnet. Für jedes Antigen wurde ein LOD

berechnet. Die Berechnung erfolgte sowohl für die FLEXMAP 3D als auch für die INTELLIFLEX. Die entsprechenden LODs sind in der Tabelle 4-4 aufgeführt.

### Intra-assay Präzision

Die Intra-assay Präzision wurde auf der FLEXMAP 3D und der INTELLIFLEX bestimmt. Zur Bestimmung wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in 12 Replikaten gemessen. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde über den Mittelwert und die SD der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. In der Tabelle 4-5 ist für jedes Antigen der Mittelwert der %CVs der einzelnen Serum-Validierungsproben gegeben. Unabhängig von der gewählten Luminex-Plattform konnte für alle Antigene eine Intra-assay Präzision von unter 5 % ermittelt werden.

**Tabelle 4-5: Intra-assay Präzision des Borrelia multiplex.**

Zur Bestimmung der Intra-assay Präzision des Borrelia multiplex wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in 12 Replikaten gemessen. Die Bestimmung erfolgte sowohl auf der FLEXMAP 3D als auch auf der INTELLIFLEX. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. In der Tabelle ist ein Mittelwert aus den %CVs der einzelnen Serum-Validierungsproben angegeben.

Antikörper- antwort	Antigen	Intra-assay Präzision (%CV)	
		FLEXMAP 3D	INTELLIFLEX
IgG	VisE - B31	1,3	1,9
	BmpA - PKo	2,4	2,8
	DbpA - ZS7	2,2	2,7
	DbpA - 20047	3,2	2,8
	DbpA - PKo	1,9	2,1
	DbpA - A14S	2,5	3,5
	DbpA - PBi	2,6	2,7
	p83/100 - PKo	4,6	4,7
	OppA-2 - PBi	1,3	2,0
IgM	OspC - 20047	1,7	2,4
	OspC - A14S	2,3	2,7

### Inter-assay Präzision

Die Inter-assay Präzision wurde ebenfalls auf der FLEXMAP 3D und der INTELLIFLEX bestimmt. Für die Bestimmung wurden die in jedem Assay mitgeführten QC-Proben verwendet. Auf der FLEXMAP 3D wurden die QC-Proben in Triplikaten gemessen. Für die Bestimmung der Inter-assay Präzision wurden fünf Läufe verwendet. Auf der INTELLIFLEX wurden die Proben in Duplikaten gemessen. Die Bestimmung erfolgte über sieben Läufe. Auch hier wurde aus den MFI-Signalen über den Mittelwert und die SD der %CV berechnet, welcher nicht über 20 % liegen sollte. In der Tabelle 4-6 ist für jedes Antigen der Mittelwert der %CVs der QC-Proben gegeben. Für die FLEXMAP 3D konnte bei allen Antigenen einen Inter-assay Präzision von unter 10 % ermittelt werden. Bei der INTELLIFLEX war die Inter-assay Präzision

bei fast allen Antigenen ebenfalls unter 10 %. Lediglich bei dem Antigen p83/100 - PKo war die Inter-assay Präzision mit 16,3 % schlechter.

**Tabelle 4-6: Inter-assay Präzision des *Borrelia multiplex*.**

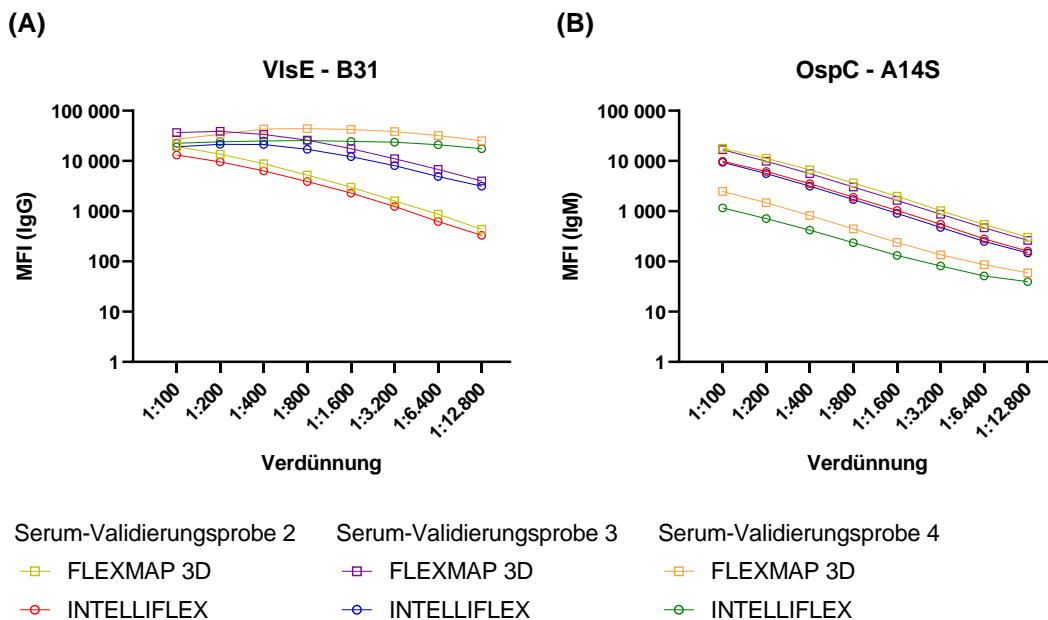
Für die Bestimmung der Inter-assay Präzision des *Borrelia multiplex* wurden die QC-Proben verwendet. Auf der FLEXMAP 3D wurden die Proben in Triplikaten über fünf Läufe gemessen. Auf der INTELLIFLEX wurden die Proben in Duplikaten über sieben Läufe gemessen. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. In der Tabelle ist ein Mittelwert aus den %CVs der einzelnen QC-Proben angegeben.

Antikörperantwort	Antigen	Inter-assay Präzision (%CV)	
		FLEXMAP 3D	INTELLIFLEX
IgG	VlsE - B31	3,6	4,7
	BmpA - PKo	4,2	6,8
	DbpA - ZS7	3,6	8,0
	DbpA - 20047	4,3	6,2
	DbpA - PKo	2,7	5,2
	DbpA - A14S	5,4	6,1
	DbpA - PBi	4,5	7,0
	p83/100 - PKo	8,7	16,3
	OppA-2 - PBi	3,2	4,2
IgM	OspC - 20047	2,1	4,0
	OspC - A14S	2,8	4,4

### Parallelität der Probenverdünnung

Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 auf der FLEXMAP 3D und der INTELLIFLEX gemessen. Aus den MFI-Signalen wurden jeweils der Mittelwert, die SD und der %CV berechnet. Der %CV sollte nicht über 20 % liegen. Die erhaltenen Verdünnungskurven der einzelnen Serum-Validierungsproben sind in der Abbildung 4-7 für die Antigene VlsE - B31 und OspC - A14S dargestellt. Die Verdünnungskurven für die anderen Antigene sind im Anhang in der Abbildung 7-26 und der Abbildung 7-27 zu finden. Für jede Verdünnungsstufe wurde der Mittelwert der Triplikate verwendet. Die dazugehörigen Standardabweichungen wurden ebenfalls eingezeichnet, sind auf Grund ihrer geringen Werte jedoch nicht erkennbar. Alle berechneten %CVs waren unter 20 %. Die Parallelität der Verdünnung unterschied sich von Probe zu Probe und war auch für die einzelnen Antigene nicht immer gleich. So konnte bei den Serum-Validierungsproben 3 und 4 teilweise keine Parallelität (z.B. VlsE - B31, DbpA - PKo) festgestellt werden oder es lag erst ab einer Verdünnung von etwa 1:3.200 (z.B. OppA-2 - PBi) eine Parallelität vor. Bei der Serum-Validierungsprobe 2 dagegen zeigte sich eine Parallelität vor allem bei einer niedrigeren Probenverdünnung. Oft war eine Parallelität zwischen einer Verdünnung von 1:200 und 1:3.200 gegeben. Eine ideale Verdünnungsstufe für alle Proben konnte jedoch nicht

ermittelt werden. Zwischen den Verdünnungskurven der FLEXMAP 3D und den Kurven der INTELLIFLEX konnten kaum Unterschiede ausgemacht werden. Die INTELLIFLEX schien jedoch bei einer höheren Verdünnung und somit niedrigeren MFI-Signalen etwas sensitiver zu sein als die FLEXMAP 3D. Dies könnte auch mit den niedrigeren Detektionsgrenzen der Antigene bei der INTELLIFLEX (Tabelle 4-4) zusammenhängen.



**Abbildung 4-7: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - I.**

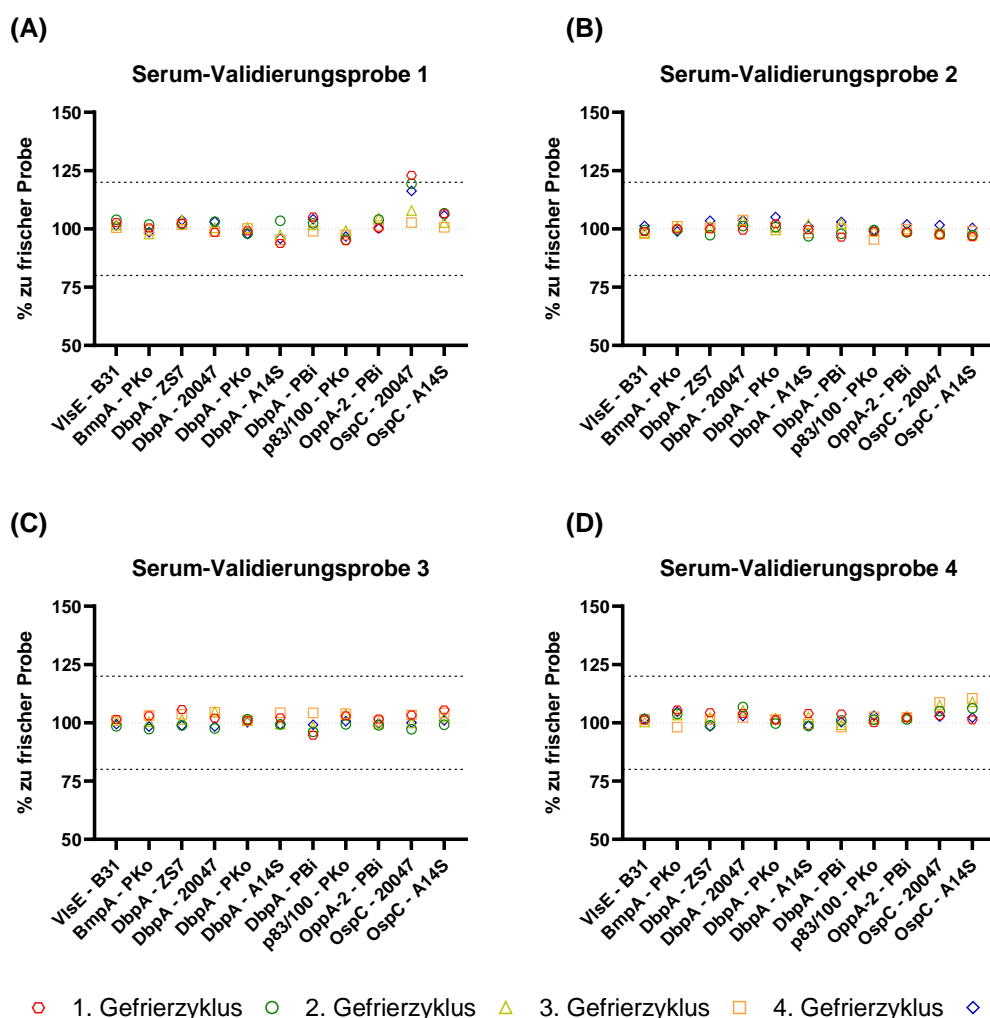
Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Die Messung erfolgte sowohl auf der FLEXMAP 3D als auch auf der INTELLIFLEX. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für das IgG-dominante Antigen VisE - B31 **(A)** und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S **(B)**. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.

### Gefrierzyklus-Stabilität

Für die Betrachtung der Gefrierzyklus-Stabilität wurden von allen Serum-Validierungsproben Aliquots mit unterschiedlichen Gefrierzyklen in Triplikaten gemessen. Je nach Aliquot waren die Proben vor der Messung 1-5-mal aufgetaut und wieder eingefroren worden. Als Referenz wurde ein Aliquot ohne Gefrierzyklus verwendet. Die Messung erfolgte auf der FLEXMAP 3D. Auf eine Messung mit der INTELLIFLEX wurde verzichtet, da die Stabilität der Proben nicht von der verwendeten Luminex-Plattform abhängig sein sollte. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurden der Mittelwert und der %CV berechnet. Der %CV sollte nicht über 20 % liegen. Die Mittelwerte für die einzelnen Gefrierzyklen wurden dann prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen. Die Abweichung sollte nicht mehr als 20 % betragen, so dass Werte im Bereich von 80 - 120 % toleriert wurden. In der Abbildung 4-8 sind die Prozentwerte zu den einzelnen Gefrierzyklen für jede Serum-Validierungsprobe und jedes Antigen dargestellt. Bei nahezu allen Serum-Validierungsproben konnten für jedes Antigen



Werte zwischen 95 % und 110 % ermittelt werden. Lediglich bei der Serum-Validierungsprobe 1 lag der Wert für den 1. Gefrierzyklus bei dem Antigen OspC - 20047 über 120 %. Auch der Wert für den 2. Gefrierzyklus war nur knapp unter 120 %. Da bei allen anderen Antigenen die Werte für diese Gefrierzyklen im tolerierten Bereich lagen, wurde ein Messfehler vermutet. Auf Grund der niedrigen Abweichung zur Referenz ist davon auszugehen, dass ein Auftauen und wieder Einfrieren der Proben bis zu fünfmal möglich ist.



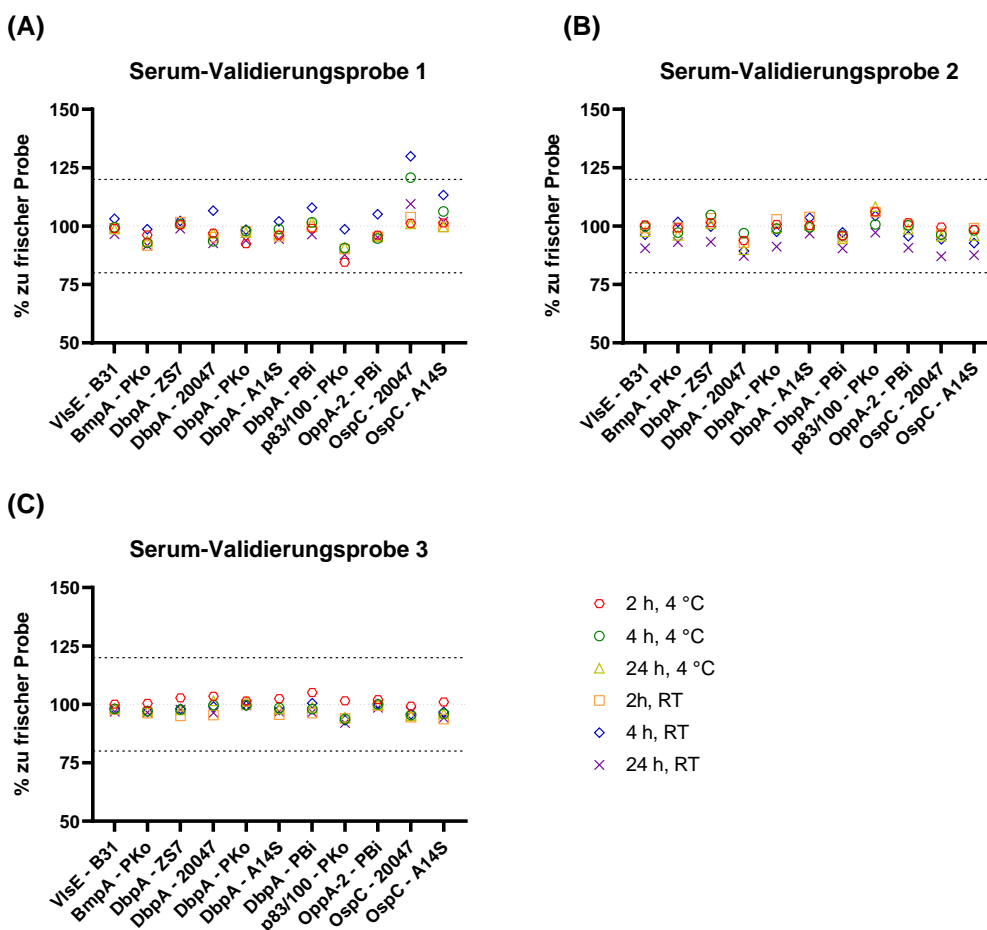
**Abbildung 4-8: Gefrierzyklus-Stabilität von Proben im *Borrelia multiplex*.**

Um die Gefrierzyklus-Stabilität zu untersuchen, wurden Aliquots aller Serum-Validierungsproben 1-5-mal aufgetaut und wieder eingefroren. Die Aliquots wurden dann in Triplikaten auf der FLEXMAP 3D gemessen. Als Referenz wurde ein Aliquot ohne Gefrierzyklus verwendet. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurde ein Mittelwert berechnet und die Mittelwerte für die unterschiedlichen Gefrierzyklen prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen.

### Kurzzeit- und Temperaturstabilität

Für die Betrachtung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wurden von den Serum-Validierungsproben 1 - 3 mehrere Aliquots bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) über verschiedene Zeiträume (2 h, 4 h, 24 h) gelagert. Die Aliquots wurden dann in Triplikaten auf

der FLEXMAP 3D gemessen. Auf eine Messung mit der INTELLIFLEX wurde erneut verzichtet. Als Referenz wurde ein bei -80 °C gelagertes Aliquot frisch aufgetaut. Auch hier wurde aus den MFI-Signalen der Mittelwert und der %CV, welcher unter 20 % sein sollte, berechnet. Die Prozentwerte aus dem Vergleich der Mittelwerte der Aliquots mit dem Referenz-Mittelwert sind in der Abbildung 4-9 für die drei Serum-Validierungsproben und jedes Antigen dargestellt. Bei allen drei Serum-Validierungsproben konnten für die meisten Antigene unabhängig von der Lagerung Werte zwischen 90 % und 110 % ermittelt werden. Lediglich bei der Serum-Validierungsprobe 1 lagen zwei Werte außerhalb des tolerierten Bereichs. Die Werte gehörten zum Antigen OspC - 20047 und betrafen die Lagerung bei 4 °C oder RT über 4 h. Da die Werte bei einer Lagerung über 24 h im tolerierten Bereich lagen, handelte es sich hier vermutlich um einen Messfehler. Der %CV lag bei allen Triplikaten unter 20 %. Die Proben schienen demnach bei unterschiedlichen Bedingungen stabil zu sein, so dass eine kurzzeitige Lagerung ohne Einfrieren der Probe möglich ist.



**Abbildung 4-9: Kurzzeit- und Temperaturstabilität von Proben im *Borrelia multiplex*.**

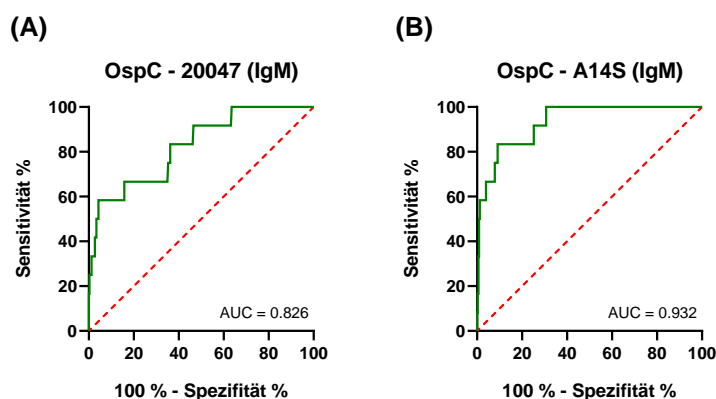
Um die Kurzzeit- und Temperaturstabilität zu untersuchen, wurden Aliquots der Serum-Validierungsproben 1 - 3 bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) über unterschiedliche Zeiträume (2 h, 4 h, 24 h) gelagert und anschließend in Triplikaten auf der FLEXMAP 3D gemessen. Als Referenz wurde ein bei -80 °C gelagertes Aliquot frisch aufgetaut. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurde ein Mittelwert berechnet und die Mittelwerte für die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen.

### 4.2.3 klinische Assay-Validierung

Um IgG- und IgM-Antikörper gleichzeitig detektieren zu können, wurde für die klinische Validierung ausschließlich die INTELLIFLEX Plattform verwendet.

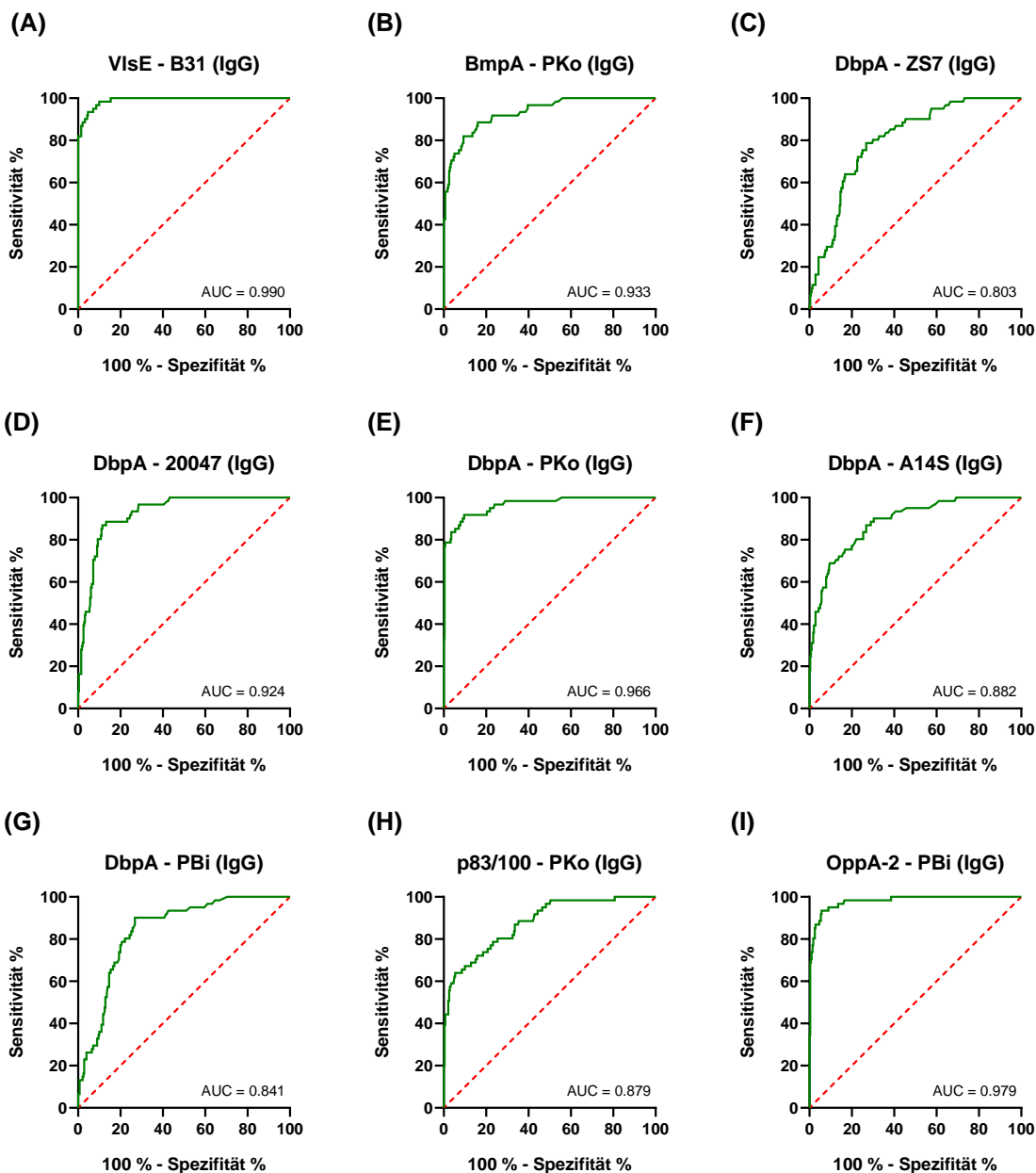
#### Cut off - Bestimmung

Um Grenzwerte (cut offs) zur Unterscheidung zwischen negativen und positiven MFI-Signalen zu bestimmen, wurden 365 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 und dem Borrelia multiplex gemessen. Basierend auf dem Ergebnis des kommerziellen Tests wurden die Proben in IgG/IgM-negativ und -positiv unterteilt. 24 Proben mit einem unklaren Ergebnis (IgG/IgM-borderline) wurden ausgeschlossen, da nur Proben mit einem eindeutigen Ergebnis verwendet werden konnten. Nach der Einteilung der Proben wurde mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia multiplex ROC-Analysen durchgeführt. Die Analysen zu den einzelnen Antigenen sind der Abbildung 4-10 und Abbildung 4-11 gezeigt. Vor allem bei den Antigenen VlsE - B31 und OppA-2 konnten sehr hohe AUC-Werte berechnet werden. Mit dem Ergebnis aus den Analysen wurde für jedes Antigen ein cut off - Wert bestimmt, wobei für die IgG-dominanten Antigene lediglich ein IgG - cut off und für die IgM-dominanten Antigene ein IgM - cut off festgelegt wurde. Die Werte wurden so gewählt, dass eine Spezifität von 95 % oder mehr erreicht wurde. Zudem wurden für jedes Antigen verschiedene cut off - Werte verglichen, um eine höchstmögliche Sensitivität des Assays zu erhalten. Dabei zeigte sich, dass cut off - Werte bei zwei DbpA-Antigenen für eine korrekte Probenklassifizierung ausreichen. Es wurden die Antigene DbpA - 20047 und DbpA - PKo ausgewählt, da die Arten *B. garinii* und *B. afzelii* in Europa dominant sind und hier auch die höchsten AUC-Werte vorlagen.



**Abbildung 4-10: ROC-Analysen - IgM-dominante Antigene des Borrelia multiplex.**

Für die ROC-Analysen wurden 341 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie verwendet. Die Analysen erfolgten mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia multiplex. Die Einteilung der Proben in IgM-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgM 2.0 der Firma Mikrogen. 329 Proben waren IgM-negativ und 12 Proben IgM-positiv. Als Maß für die Qualität der Klassifizierung wurde bei jedem Antigen der AUC-Wert berechnet.



**Abbildung 4-11: ROC-Analysen - IgG-dominante Antigene des Borrelia multiplex.**

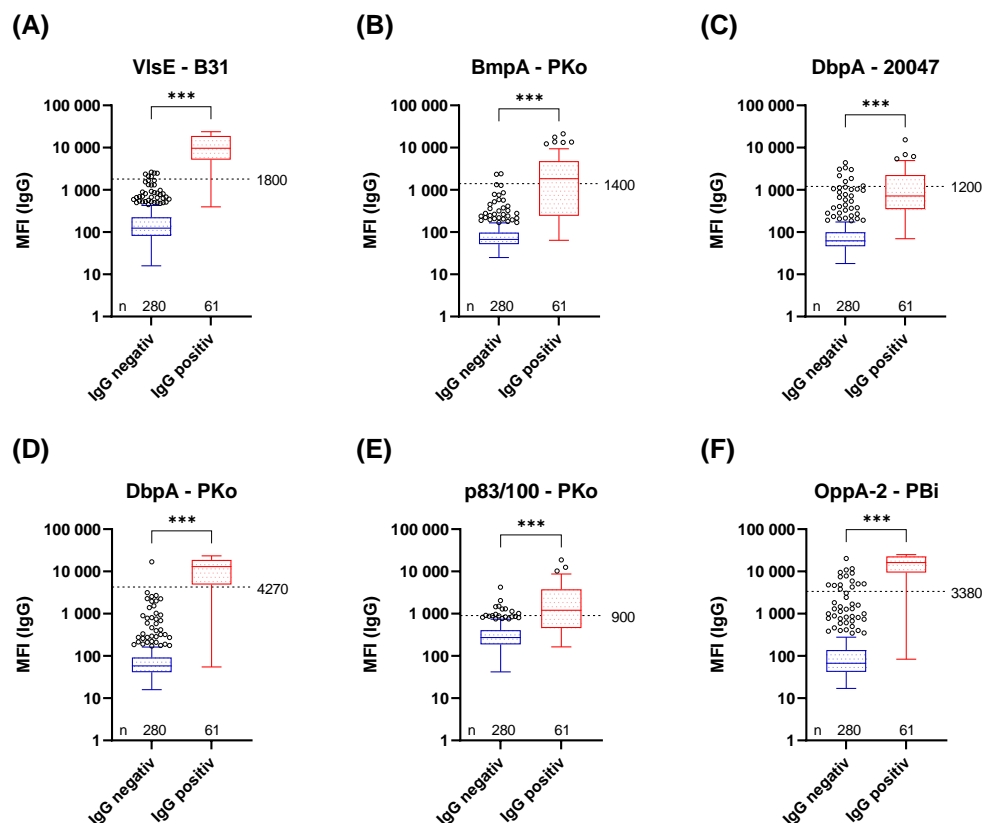
Für die ROC-Analysen wurden 341 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie verwendet. Die Analysen erfolgten mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia multiplex. Die Einteilung der Proben in IgG-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG 2.0 der Firma Mikrogen. 280 Proben waren IgG-negativ und 61 Proben IgG-positiv. Als Maß für die Qualität der Klassifizierung wurde bei jedem Antigen der AUC-Wert berechnet.

Nach der Festlegung der cut offs wurden cut off - Proben (CO-Proben) nach Planatscher et al. (2013)<sup>99</sup> generiert. Dafür wurden verschiedene Serum-Proben mit hohen und niedrigen MFI-Signalen in einer linearen Verdünnungsreihe gemessen und für jedes Antigen ein cut off - Bereich um den gewünschten cut off definiert. Mit Hilfe von RStudio (Version 1.2.5001) wurde bei allen Antigenen für jede Verdünnungsreihe ein Fit erstellt, was eine Abschätzung des Verhaltens der Seren in Kombination ermöglichte. Daraufhin wurden verschiedene

Serumkombinationen ermittelt, bei denen die entsprechenden MFI-Signale die definierten cut off - Werte erreichten. Insgesamt konnten alle cut offs durch drei CO-Proben abgedeckt werden. CO-Probe 1 wurde für den cut off des Antigens BmpA - PKo verwendet. CO-Probe 2 passte für die cut offs der Antigene p83/100 - PKo und OspC - A14S. Die cut offs der übrigen Antigene wurden durch die CO-Probe 3 abgedeckt. Die CO-Proben wurden in jede Messung einbezogen, um einen Einfluss von Plattenschwankungen auf die Probenklassifizierung zu vermeiden.

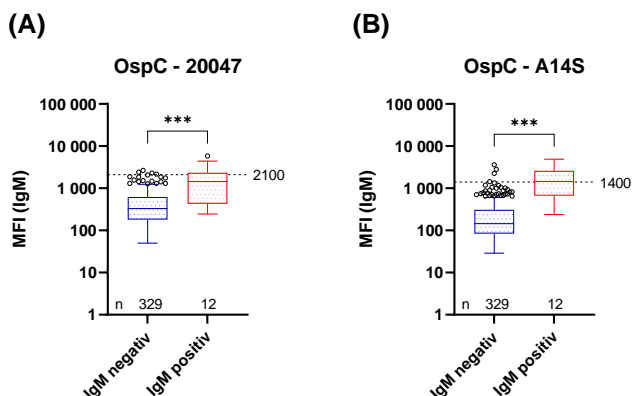
### Probenklassifizierung

Die Verteilung der MFI-Signale bei den in IgG/IgM-negativ und IgG/IgM-positiv unterteilten Proben wurde für jedes Antigen mit einem cut off in einem Box-Whisker-Plot graphisch dargestellt (Abbildung 4-12 und Abbildung 4-13). Der festgelegten cut off - Werte sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.



**Abbildung 4-12: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale der MEMO-Proben im Borrelia multiplex.**

Mit den Box-Whisker-Plots wurde die Verteilung der MFI-Signale aus dem Borrelia multiplex von 341 Serum-Proben der deutschen MEMO-Studie graphisch dargestellt. Die Einteilung der Proben in IgG-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG 2.0 der Firma Mikrogen. 280 Proben waren IgG-negativ und 61 Proben IgG-positiv. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Die festgesetzten Grenzwerte (cut offs) sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)



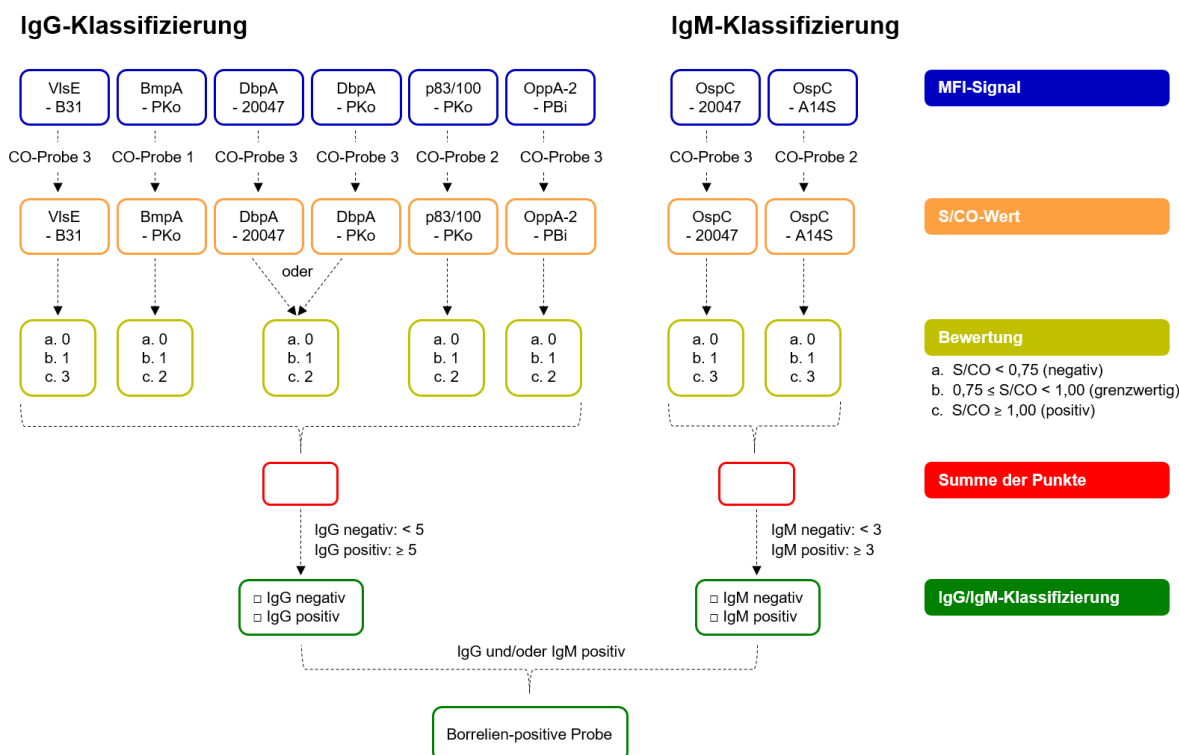
**Abbildung 4-13: Box-Whisker-Plots der IgM-Signale der MEMO-Proben im *Borrelia multiplex*.**

Mit den Box-Whisker-Plots wurde die Verteilung der MFI-Signale aus dem *Borrelia multiplex* von 341 Serum-Proben der deutschen MEMO-Studie graphisch dargestellt. Die Einteilung der Proben in IgM-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead *Borrelia* IgM 2.0 der Firma Mikrogen. 329 Proben waren IgM-negativ und 12 Proben IgM-positiv. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Die festgesetzten Grenzwerte (cut offs) sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

Bei allen Antigenen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den negativen und positiven Proben festgestellt werden. Allerdings waren die Unterschiede bei einigen Antigenen geringer als bei anderen (z. B. OppA-2 - PBi vs. OspC - 20047). Zudem gab es bei allen Antigenen Ausreißer, die als Punkte außerhalb der Antennen eingezeichnet sind. Dies zeigte, dass eine korrekte Probenklassifizierung nur durch eine Kombination mehrerer Antigene erreicht werden kann.

Ein Überblick über den Klassifizierungsprozess gibt die Abbildung 4-14. Als erstes wurde bei jedem Antigen das entsprechende MFI-Signale der Probe (S) durch das MFI-Signal der zum Antigen gehörenden CO-Probe (CO) dividiert. Daraus resultierte für jedes Antigen ein S/CO-Wert. Die Werte wurden dann nach einem Punktesystem bewertet. Dabei wurde zwischen drei Kategorien unterschieden: negativ ( $S/CO < 0,75$ ), grenzwertig ( $S/CO$  zwischen 0,75 und 1,00) und positiv ( $S/CO \geq 1,00$ ). Bei einem negativen S/CO konnte für das entsprechende Antigen keine Antikörperantwort nachgewiesen werden. Hierfür wurden null Punkte vergeben. Bei einem grenzwertigen S/CO war eine geringe Antikörperantwort nicht auszuschließen. Hier wurde daher ein Punkt vergeben. Bei einem positiven S/CO war von einer starken Antikörperantwort gegen das entsprechende Antigen auszugehen. Je nach Antigen wurden hier zwei oder drei Punkte vergeben. So wurde bei den Antigenen BmpA - PKo, DbpA - 20047 / PKo, p83/100 - PKo und OppA-2 - PBi zwei Punkte vergeben, da diese zwar spezifisch für eine Borrelien-Infektion sind, eine Antikörperreaktion jedoch nicht zwangsläufig bei allen Patienten auftritt. Bei den Antigenen VlsE - B31, OspC - 20047 und OspC - A14S wurden drei Punkte vergeben. Diese Antigene sind die wichtigsten IgG- bzw.

IgM-dominanten Antigene und lösen bei den meisten Patienten eine Immunreaktion aus. Mit Ausnahme der DbpA-Antigene wurde jedes Antigen einzeln bewertet. Die DbpA-Antigene dagegen wurden zusammen betrachtet, wobei der höchste S/CO-Wert bewertet wurde. Anschließend wurden alle Punkte addiert und über die Summe der Punkte die Probe klassifiziert. Bei einer Summe  $\geq 5$  war die Probe IgG-positiv. Bei einer Summe  $\geq 3$  war sie IgM-positiv. Sobald eine Probe für eine Antikörperklasse positiv war, wurde die gesamte Probe als Borreliose-positiv klassifiziert.



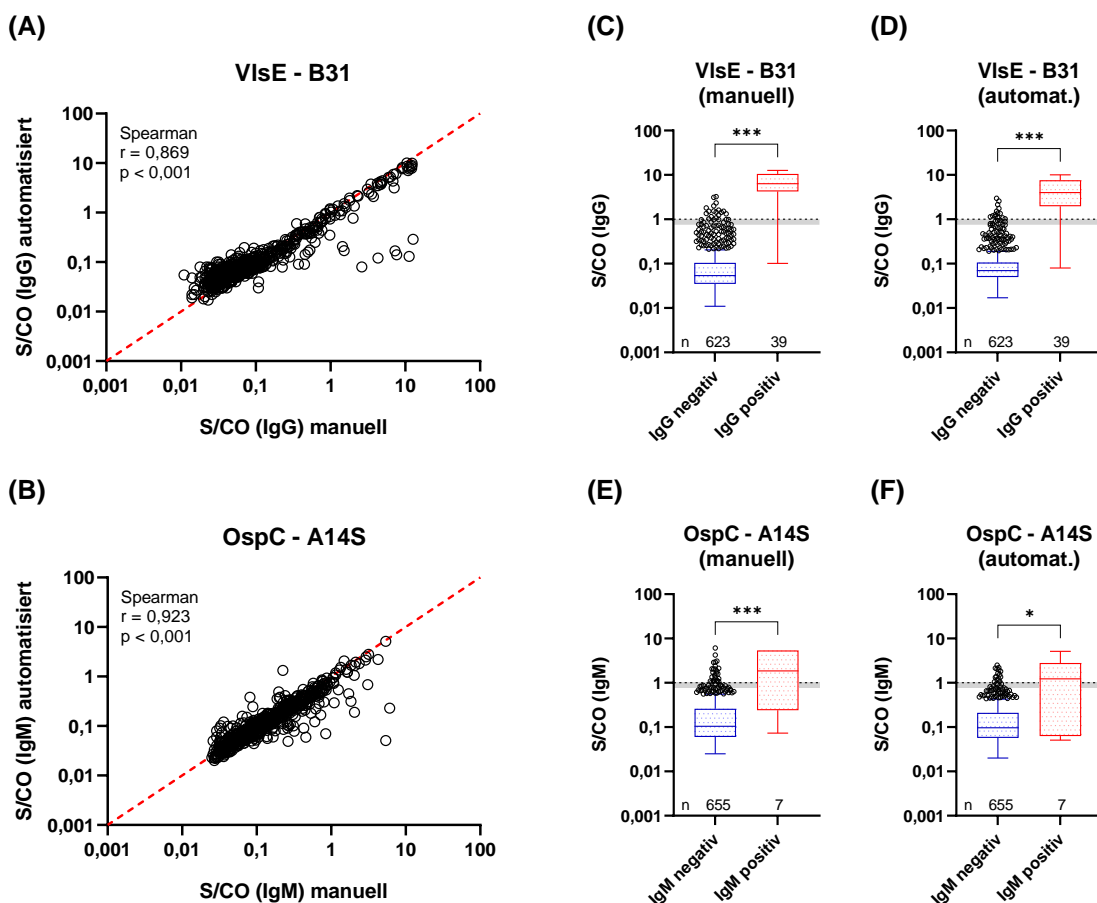
**Abbildung 4-14: Probenklassifizierung - Borrelia multiplex.**

Die Probenklassifizierung erfolgte über sechs IgG-dominante und zwei IgM-dominante Antigene. Die MFI-Signale der Proben (S) wurden bei diesen Antigenen durch das MFI-Signal der entsprechenden CO-Probe (CO) dividiert. Die erhaltenen S/CO-Werte wurden dann nach einem Punktesystem bewertet. S/CO-Werte zwischen 0,75 und 1,00 (grenzwertig) bekamen einen Punkt. S/CO-Werte  $\geq 1,00$  (positiv) wurden bei den Antigenen BmpA, DbpA, p83/100 und OppA-2 mit zwei Punkten bewertet. Bei dem Antigen VlsE und den OspC-Antigenen wurden drei Punkte vergeben. S/CO-Werte  $< 0,75$  (negativ) wurden mit null Punkten bewertet. Bei den DbpA-Antigenen wurde nur der höhere der beiden S/CO-Werte bewertet. Die Punkte für die einzelnen Antigene wurden anschließend addiert. Bei einer Summe  $\geq 5$  war die Probe IgG-positiv, bei einer Summe  $\geq 3$  IgM-positiv. Sobald eine Probe für eine Antikörperklasse positiv war, wurde die gesamte Probe als Borreliose positiv eingestuft.

#### 4.2.4 Assay-Automatisierung

Um den *Borrelia multiplex* auch in großen Proben screenings einsetzen zu können, wurde der Assay für die Verwendung eines Pipettierroboters (Biomek i7) modifiziert. Für Messungen im Hochdurchsatz wurde das Plattenformat von 96 half-well auf 384 well geändert. Für einen

Vergleich der manuellen und automatisierten Durchführung wurden 662 Serum-Proben aus der deutschen MuSPAD-Studie analysiert. Die Messungen erfolgten auf der INTELLIFLEX. Korrelationsanalysen zum Vergleich sind in der Abbildung 4-15 (A-B) sowie im Anhang in Abbildung 7-28 (A-C) und Abbildung 7-29 (A-C) zu finden. Box-Whisker-Plots zur Verteilung der MFI-Signale sind in der Abbildung 4-15 (C-F) sowie im Anhang in Abbildung 7-28 (D-I) und Abbildung 7-29 (D-I) gezeigt.



**Abbildung 4-15: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - I.**

Um eine manuelle Durchführung des Borrelia multiplex mit einer automatisierten Durchführung zu vergleichen, wurden 662 Serum-Proben der deutschen MuSPAD-Studie analysiert. Die Proben wurden auf der INTELLIFLEX gemessen. Für den Vergleich wurden die S/CO-Werte verwendet. In (A-B) sind die S/CO-Werte in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Die rote Gerade ( $x = y$ ) gibt den Fall identischer S/CO-Werte. Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. In (C-E) wird die Verteilung der S/CO-Werte betrachtet. Die Einteilung der Proben in IgG/IgM-negativ und -positiv basiert auf einer Messung der Proben mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Die gestrichelte Linie (S/CO-Wert = 1,00) zeigt die Grenze zwischen positiven und negativen Werten. Der graue Bereich darunter gibt den Grenzbereich ( $0,75 < S/CO < 1,00$ ) an. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)



Bei fast allen Antigenen wurden bei manueller Durchführung zum Teil höhere S/CO-Werte berechnet als bei der automatisierten Durchführung. Die Box-Whisker-Plots zur Verteilung der S/CO-Werte zeigten, dass die unterschiedlichen S/CO-Werte hauptsächlich bei IgG/IgM-positiven Proben vorkamen. Die Einteilung in IgG/IgM-negativ und -positiv erfolgte basierend auf einer Messung der Proben mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik durch das alphaomega Labor in Leipzig.

Eine Klassifizierung der Proben ergab eine hohe Übereinstimmung zwischen der manuellen und der automatisierten Durchführung. So konnte bei 98,5 % der Proben (n = 652) der gleiche IgG-Serostatus ermittelt werden. Bei der IgM-Klassifizierung gab es eine Übereinstimmung bei 97,6 % der Proben (n = 646). Die Proben mit einer unterschiedlichen Klassifizierung waren vor allem bei der manuellen Durchführung positiv und bei der automatisierten Durchführung negativ.

#### **4.2.5 Assay-Präzision**

Um die Genauigkeit des *Borrelia multiplex* zu bestimmen, wurden 319 Proben aus dem bereits für die klinische Validierung gemessenen Probenset der MEMO-Studie verwendet. Das Ergebnis der Klassifizierung wurde mit der vorherigen Einteilung der Proben in IgG/IgM-negativ bzw. IgG/IgM-positiv basierend auf dem kommerziellen Test recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 verglichen. Neben einer Gesamtbetrachtung (IgG/IgM) wurden beide Antikörperklassen auch einzeln betrachtet. Die berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten inklusive PPV und NPV sind in der Tabelle 4-7 aufgeführt. Neben der Sensitivität und Spezifität bei einer manuellen Durchführung des *Borrelia multiplex* wurde die Sensitivität und Spezifität auch bei einer automatisierten Durchführung ermittelt. Bei der manuellen Durchführung ergab sich eine IgG/IgM-Sensitivität von 93,7 % (95%CI 84,8 - 97,5 %) und eine IgG/IgM-Spezifität von 96,5 % (95%CI 93,5 - 98,1 %). Bei einer automatisierten Durchführung war die Sensitivität um etwa 10 % geringer (manuelle Durchführung: 93,7 %, automatisierte Durchführung: 84,1 %) und auch ein Verlust der Spezifität (manuelle Durchführung: 96,5 %, automatisierte Durchführung: 90,2 %) konnte festgestellt werden. Im Allgemeinen gab es zwischen dem *Borrelia multiplex* und dem kommerziellen Test recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 größere Unterschiede bei der IgM-Klassifizierung als bei der IgG-Klassifizierung. Dies spiegelte sich auch in den berechneten Cohen's Kappa Koeffizienten (Anhang: Tabelle 7-1) wieder. Bei einer manuellen Durchführung des *Borrelia multiplex* konnten sechs Proben (1,9 %) als IgM-positiv klassifiziert werden, welche jedoch im kommerziellen Test IgM-negativ waren. Umgekehrt waren fünf Proben (1,8 %) im kommerziellen Test positiv, im *Borrelia multiplex* jedoch negativ.

**Tabelle 4-7: Sensitivität und Spezifität des Borrelia multiplex im Vergleich zum kommerziellen Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0.**

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität des Borrelia multiplex im Vergleich zum kommerziellen Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 wurden 319 Proben aus der MEMO-Studie verwendet. Die Sensitivität und Spezifität wurde sowohl bei einer manuellen Durchführung des Borrelia multiplex als auch bei einer automatisierten Durchführung bestimmt. Die in Klammern angegebenen Konfidenzintervalle (95%CI) wurden nach Wilson/Brown berechnet.

Klassifizierung	Sensitivität			Spezifität			
	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung	manuelle Durchführung	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung	automatisierte Durchführung	
<b>IgG/IgM</b>	recomBead Borrelia positiv: 63 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 59 - Sens.: 93,7 % (84,8 - 97,5 %) - PPV: 86,8 %	recomBead Borrelia positiv: 63 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 53 - Sens.: 84,1 % (73,2 - 91,1 %) - PPV: 67,9 %	recomBead Borrelia negativ: 256 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 247 - Spez.: 96,5 % (93,5 - 98,1 %) - NPV: 98,4 %	recomBead Borrelia negativ: 256 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 231 - Spez.: 90,2 % (86,0 - 93,3 %) - NPV: 95,9 %	recomBead Borrelia positiv: 63 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 56 - Sens.: 96,6 % (88,3 - 99,4 %) - PPV: 93,3 %	recomBead Borrelia positiv: 58 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 50 - Sens.: 86,2 % (75,1 - 92,8 %) - PPV: 71,4 %	recomBead Borrelia negativ: 261 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 241 - Spez.: 92,3 % (88,5 - 95,0 %) - NPV: 96,8 %
<b>IgG</b>	recomBead Borrelia positiv: 11 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 6 - Sens.: 54,5 % (28,0 - 78,7 %) - PPV: 50,0 %	recomBead Borrelia positiv: 11 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 45,5 % (21,3 - 72,0 %) - PPV: 45,5 %	recomBead Borrelia negativ: 308 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 302 - Spez.: 98,1 % (95,8 - 99,1 %) - NPV: 98,4	recomBead Borrelia negativ: 308 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 302 - Spez.: 98,1 % (95,8 - 99,1 %) - NPV: 98,1 %	recomBead Borrelia positiv: 11 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 6 - Sens.: 54,5 % (28,0 - 78,7 %) - PPV: 50,0 %	recomBead Borrelia positiv: 11 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 45,5 % (21,3 - 72,0 %) - PPV: 45,5 %	recomBead Borrelia negativ: 308 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 302 - Spez.: 98,1 % (95,8 - 99,1 %) - NPV: 98,4

**Tabelle 4-8: Sensitivität und Spezifität des Borrelia multiplex im Vergleich zur konventionellen 2-Stufen-Diagnostik.**

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität des Borrelia multiplex im Vergleich zur konventionellen 2-Stufen-Diagnostik wurden 662 Proben aus der MuSPAD-Studie verwendet. Die konventionelle 2-Stufen-Diagnostik bestand aus einem ELISA als Suchtest und einem Immunoblot als Bestätigungstest. Die Sensitivität und Spezifität wurde sowohl bei manueller Durchführung des Borrelia multiplex als auch bei einer automatisierten Durchführung bestimmt. Die in Klammern angegebenen Konfidenzintervalle (95%CI) wurden nach Wilson/Brown berechnet.

Klassifizierung	Sensitivität			Spezifität			
	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung	manuelle Durchführung	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung	automatisierte Durchführung	
<b>IgG + IgM</b>	ELISA / Immunoblot positiv: 42 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 40 - Sens.: 95,2 % (84,2 - 99,2 %) - PPV: 47,6 %	ELISA / Immunoblot positiv: 42 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 36 - Sens.: 85,7 % (72,2 - 93,3 %) - PPV: 53,7 %	ELISA / Immunoblot positiv: 42 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 576 - Spez.: 93,0 % (90,6 - 94,7 %) - NPV: 99,7 %	ELISA / Immunoblot negativ: 620 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 589 - Spez.: 95,0 % (93,0 - 96,5 %) - NPV: 99,0 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 11,6 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %
<b>IgG</b>	ELISA / Immunoblot positiv: 39 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 37 - Sens.: 94,9 % (83,1 - 99,1 %) - PPV: 80,4 %	ELISA / Immunoblot positiv: 39 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 32 - Sens.: 82,1 % (67,3 - 91,0 %) - PPV: 80,0 %	ELISA / Immunoblot positiv: 39 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 614 - Spez.: 98,6 % (97,3 - 99,2 %) - NPV: 99,7 %	ELISA / Immunoblot negativ: 623 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 615 - Spez.: 98,7 % (97,5 - 99,3 %) - NPV: 98,9 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 11,6 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %
<b>IgM</b>	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 11,6 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 617 - Spez.: 94,2 % (92,1 - 95,7 %) - NPV: 99,7 %	ELISA / Immunoblot negativ: 655 Borrelia multiplex: - richtig negativ: 631 - Spez.: 96,3 % (94,6 - 97,5 %) - NPV: 99,7 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 11,6 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %	ELISA / Immunoblot positiv: 7 Borrelia multiplex: - richtig positiv: 5 - Sens.: 71,4 % (35,9 - 94,9 %) - PPV: 17,2 %

Zusätzlich zum Vergleich mit dem kommerziellen Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 wurde der Borrelia multiplex mit einer konventionellen 2-Stufen-Diagnostik verglichen (Tabelle 4-8). Dafür wurden Proben der MuSPAD-Studie verwendet. Die Messung der Proben mit der 2-Stufen-Diagnostik erfolgte durch das alphaomega Labor in Leipzig. Als erstes wurden alle Proben mit einem ELISA (Borrelia afzelii + VisE IgG Europe ELISA / Borrelia afzelii IgM ELISA) gemessen. Bei einem positiven oder grenzwertigen Ergebnis wurden die Proben anschließend mit einem Immunoblot (Borrelia Europe plus TpN17 LINE IgG / Borrelia Europe LINE IgM) getestet. Der Borrelia multiplex wurde einmal manuell und einmal mit dem Pipettierroboter durchgeführt. Auch bei diesem Vergleich konnte eine geringere Sensitivität bei automatisierter Durchführung festgestellt werden. Bei der Spezifität gab es keinen größeren Unterschied zwischen der manuellen und der automatisierten Durchführung. Bei der IgM-Klassifizierung gab es die größten Unterschiede zwischen dem Borrelia multiplex und der 2-Stufen-Diagnostik, was sich auch in den berechneten Cohen's Kappa Koeffizienten (Anhang: Tabelle 7-1) zeigte. Bei einer manuellen Durchführung des Borrelia multiplex konnten 38 Proben (5,7 %) als IgM-positiv klassifiziert werden, welche bei der 2-Stufen-Diagnostik IgM-negativ waren. Umgekehrt wurden mit der 2-Stufen-Diagnostik zwei Proben (0,3 %) als IgM-positiv eingestuft, welche im Borrelia multiplex IgM-negativ waren. Alles in allem konnten die aus dem Vergleich mit dem kommerziellen Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 berechnete Sensitivität und Spezifität durch den Vergleich mit einer konventionellen 2-Stufen-Diagnostik bestätigt werden.

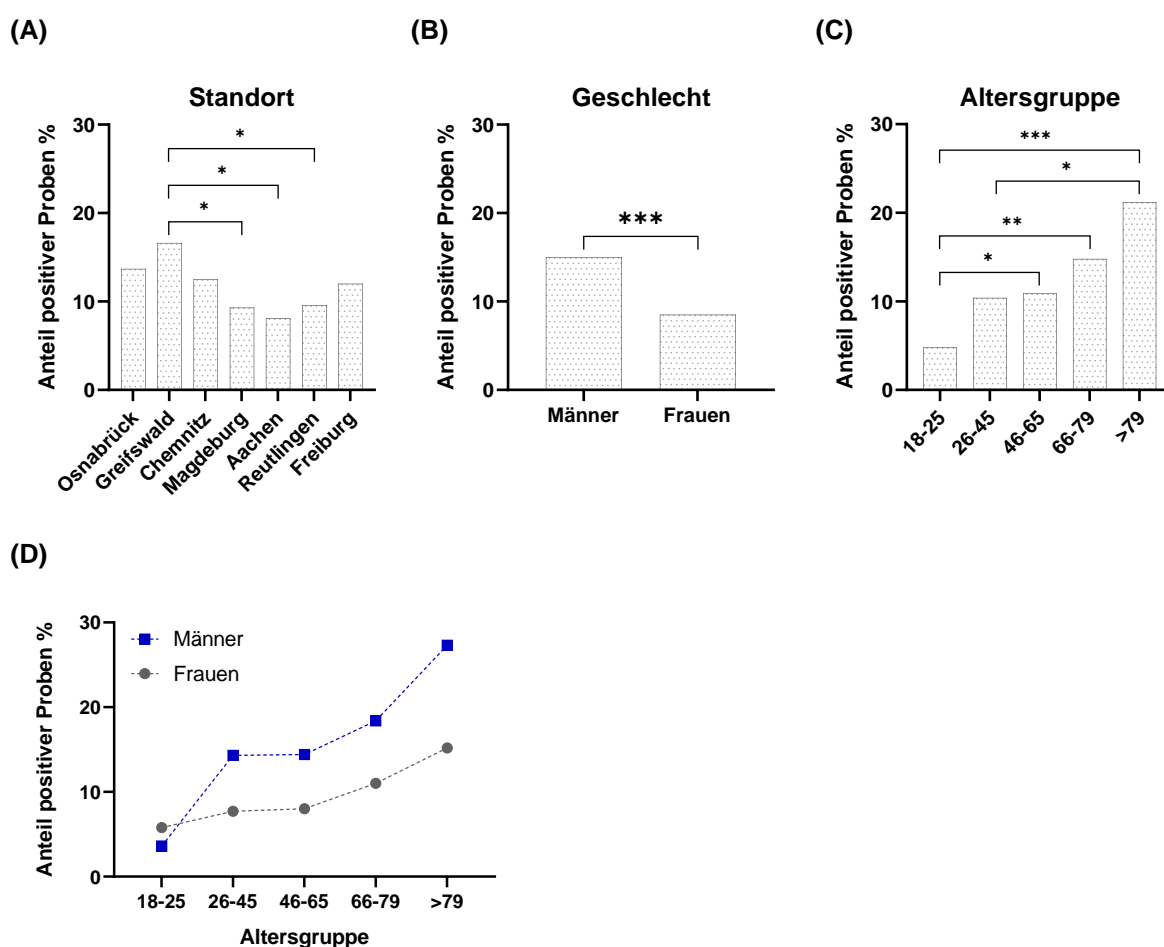
#### 4.2.6 Messung von Serum-Proben der MuSPAD-Studie

Abschließend wurden mit dem automatisierten Borrelia multiplex 1.555 Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie analysiert. Von diesen waren 115 Proben (7,4 %, 95%CI 6,2 - 8,8 %) IgG-positiv. 73 Proben (4,7 %, 95%CI 3,8 - 5,9 %) waren IgM-positiv. Daraus ergab sich eine IgG/IgM-Seropositivität von 11,4 % (95%CI 10,0 - 13,1 %, n = 178).

Die Proben wurden an sieben verschiedenen Standorten in Deutschland gesammelt. Ein Vergleich des Anteils an IgG/IgM-positiven Proben an den jeweiligen Standorten ist in Abbildung 4-16 (A) zu finden. Greifswald hatte mit 16,6 % (95%CI 11,8 - 22,8 %) den höchsten Anteil an positiven Proben. Im Vergleich dazu wurden in Magdeburg (9,3 %, 95%CI 6,1 - 14,0 %), Aachen (8,1 %, 95%CI 4,9 - 13,2 %) und Reutlingen (9,6 %, 95%CI 6,9 - 13,2 %) signifikant niedrigere Anteile ermittelt. Auch in Osnabrück (13,7 %, 95%CI 9,4 - 19,6 %), Chemnitz (12,5 %, 95%CI 8,4 - 18,2 %) und Freiburg (12,0 %, 95%CI 8,8 - 16,2 %) konnte eine niedrigere Seropositivität festgestellt werden. Hier waren die Unterschiede gegenüber Greifswald jedoch nicht signifikant. Die Verteilung der IgG/IgM-Positivität nach Geschlecht ist in Abbildung 4-16 (B) gezeigt. Der Anteil an positiven Männern (15,0 %, 95%CI 12,5 - 17,8 %) war nahezu doppelt so hoch wie der Anteil an positiven Frauen (8,5 %, 95%CI 6,8 - 10,6 %).

Signifikante Unterschiede gab es auch bei der Betrachtung verschiedener Altersgruppen, gezeigt in Abbildung 4-16 (C). Der Prozentsatz positiver Proben in der Gruppe der 18- bis 25-Jährigen betrug 4,8 % (95%CI 2,2 - 10,1 %) und stieg in der Gruppe der über 79-Jährigen auf 21,2 % (95%CI 13,1 - 32,5 %). In der Abbildung 4-16 (D) wird ebenfalls der Prozentsatz an positiven Proben in den verschiedenen Altersgruppen betrachtet. Hier findet sich jedoch zusätzliche eine Unterscheidung der Geschlechter. Der Anteil an positiven Proben bei den Männern war in fast allen Altersgruppen höher als bei den Frauen. Nur in der Altersgruppe der 18- bis 25-Jährigen war der Anteil an positiven Proben bei den Frauen etwas höher.

Die absoluten Werte und die entsprechenden Prozente aus den Analysen sind im Anhang in der Tabelle 7-2 aufgeführt.



**Abbildung 4-16: Analyse von Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie.**

1.555 Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie wurden mit dem automatisierten *Borrelia multiplex* gemessen. Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Bezug auf Standort (A), Geschlecht (B) und Altersgruppe (C). Es wurde der Anteil an positiven Proben verglichen. Bei den verschiedenen Altersgruppen wurde zusätzlich der Anteil positiver Proben zwischen den Geschlechtern verglichen (D). Zur Ermittlung von Signifikanzen wurde der Fisher's Exact Test verwendet. Die Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

### 4.3 Detektion der Immunantwort bei einer Neuroborreliose (*Borrelia neuroplex*)

#### 4.3.1 Assay-Entwicklung

##### CXCL13-Standardkurve

Für die Detektion des Chemokins CXCL13 musste zunächst ein geeignetes Antikörperpaar, bestehend aus einem Fängerantikörper und einem Detektionsantikörper gefunden werden. Dazu wurden drei CXCL13-Antikörper in verschiedenen Kombinationen getestet. Die Antikörper wurden einmal als biotinylierte Antikörper (3-Schritt-Assay) und einmal als PE-konjugierte Antikörper (2-Schritt-Assay) verwendet. Die Tests erfolgten mit einer erweiterten STD-Kurve von 20.000 pg/mL bis 1,02 pg/mL. Als Assaypuffer wurde CBST verwendet. Die MFI-Signale zu den Kombinationen mit den biotinylierten Antikörpern sind in der Tabelle 4-9 gezeigt. Bei der Kombination eines gt-a-huCXCL13 als Fängerantikörper und eines biot. ms-a-huCXCL13 als Detektionsantikörper waren die MFI-Signale am niedrigsten. Diese Kombination war daher nicht für die CXCL13-Detektion im *Borrelia neuroplex* geeignet. Bei den Kombinationen rb-a-huCXCL13 + biot. ms-a-huCXCL13 und rb-a-huCXCL13 + biot. gt-a-huCXCL13 waren die MFI-Signale zwar deutlich höher, allerdings waren diese Kombinationen auf Grund des hohen blanks ebenfalls nicht geeignet. Am besten geeignet schien die Kombination des ms-a-huCXCL13 als Fängerantikörper und des biot. gt-a-huCXCL13 als Detektionsantikörper. Hier waren die MFI-Signale auch bei den niedrigen STD-Kurvenpunkten noch ausreichend hoch. Bei den Kombinationen mit den PE-konjugierten Antikörpern (Tabelle 4-10) zeigte sich ebenfalls die Kombination aus dem ms-a-huCXCL13 und dem gt-a-huCXCL13-PE als am besten geeignet. Bei den anderen Kombinationen waren die MFI-Signale bzw. das Verhältnis von MFI zu blank (MFI/bl.) zu niedrig. Die STD-Kurven der am geeignetsten Kombinationen sind in der Abbildung 4-17 dargestellt. Bei dem direkten Vergleich erschien die Kombination mit dem biotinylierten Antikörper besser geeignet. Die Kurve war im oberen Bereich zwar früh im Plateau, im unteren Bereich dagegen wurde das Plateau erst mit dem letzten STD-Kurvenpunkt erreicht. Bei der Kombination mit dem PE-konjugierten Antikörper begann das untere Plateau bereits einen STD-Kurvenpunkt früher. Da CXCL13-Konzentrationen von < 30 pg/mL bis > 250 pg/mL erwartet wurden, war eine hohe Sensitivität vor allem im unteren Bereich der STD-Kurve notwendig.

Im Laufe der weiteren Assay-Entwicklung wurde die STD-Kurve auf sieben STD-Kurvenpunkte reduziert. Der höchste STD-Kurvenpunkt lag bei 1.515 pg/mL. Der unterste STD-Kurvenpunkt war bei 2,08 pg/mL.

**Tabelle 4-9: Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion - biotinylierte Antikörper.**

Um geeignete Antikörper für die CXCL13-Detektion zu finden, wurden drei CXCL13-Antikörper in verschiedenen Kombinationen getestet. Die Antikörper wurden dabei entweder als Fängerantikörper oder als biotinylierter Detektionsantikörper eingesetzt. Als Assaypuffer wurde CBST verwendet. Es wurde eine erweiterte STD-Kurve von 20.000 pg/mL bis 1,02 pg/mL in Duplikaten mit einem 3-Schritt-Assay gemessen. Die Auswahl einer geeigneten Kombination erfolgte über die Mittelwerte der MFI-Signale und das Verhältnis von MFI zu blank.

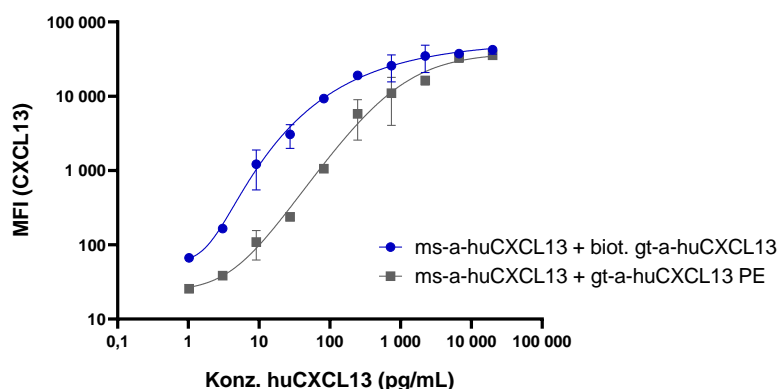
Konz. huCXCL13 (pg/mL)	rb-a-huCXCL13		gt-a-huCXCL13		rb-a-huCXCL13		ms-a-huCXCL13		gt-a-huCXCL13		ms-a-huCXCL13	
	biot. ms-a-huCXCL13		biot. gt-a-huCXCL13		biot. rb-a-huCXCL13		biot. ms-a-huCXCL13		biot. gt-a-huCXCL13		biot. rb-a-huCXCL13	
	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.
20.000	29.719	88,9	17.121	183,4	34.801	36,5	42.203	1.372,4	16.316	810,7	27.317	1.207,4
6.667	30.699	91,9	15.662	167,7	26.272	27,5	37.351	1.214,7	11.148	553,9	22.779	1.006,8
2.222	28.072	84,0	15.954	170,9	26.757	28,0	34.742	1.129,8	10.732	533,3	23.149	1.023,1
741	19.834	59,4	12.910	138,3	20.686	21,7	25.794	838,8	8.845	439,5	17.199	760,2
247	9.525	28,5	6.531	69,9	20.606	21,6	19.062	619,9	4.595	228,3	9.361	413,7
82,3	3.394	10,2	2.406	25,8	12.680	13,3	9.268	301,4	1.631	81,0	3.941	174,2
27,4	1.252	3,7	597	6,4	5.528	5,8	3.062	99,6	518	25,7	1.673	73,9
9,14	695	2,1	283	3,0	2.198	2,3	1.217	39,6	173	8,6	421	18,6
3,05	579	1,7	222	2,4	1.429	1,5	165	5,4	55	2,7	136	6,0
1,02	345	1,0	105	1,1	1.127	1,2	67	2,2	30	1,5	53	2,3
blank (bl.)	334		93		954		31		20		23	

**Tabelle 4-10: Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion - PE-konjugierte Antikörper.**

Um geeignete Antikörper für die CXCL13-Detektion zu finden, wurden drei CXCL13-Antikörper in verschiedenen Kombinationen getestet. Die Antikörper wurden dabei entweder als Fängerantikörper oder als PE-konjugierter Detektionsantikörper eingesetzt. Als Assaypuffer wurde CBST verwendet. Es wurde eine erweiterte STD-Kurve von 20.000 pg/mL bis 1,02 pg/mL in Duplikaten mit einem 2-Schritt-Assay gemessen. Die Auswahl einer geeigneten Kombination erfolgte über die Mittelwerte der MFI-Signale und das Verhältnis von MFI zu blank.

Konz. huCXCL13 (pg/mL)	rb-a-huCXCL13		gt-a-huCXCL13		rb-a-huCXCL13		ms-a-huCXCL13		gt-a-huCXCL13		ms-a-huCXCL13	
	ms-a-huCXCL13 PE		gt-a-huCXCL13 PE		gt-a-huCXCL13 PE		ms-a-huCXCL13 PE		rb-a-huCXCL13 PE		ms-a-huCXCL13 PE	
	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.	MFI	MFI/bl.
20.000	10.034	253,0	5.160	35,6	17.176	243,0	35.604	1.136,3	512	18,2	3.110	141,4
6.667	8.378	211,2	4.434	30,6	14.906	210,9	32.948	1.051,5	380	13,5	2.922	132,8
2.222	5.687	143,4	3.859	26,7	9.940	140,7	16.272	519,3	236	8,4	1.133	51,5
741	4.513	113,8	3.532	24,4	6.995	99,0	10.978	350,4	151	5,4	485	22,0
247	1.098	27,7	1.163	8,0	4.019	56,9	5.771	184,2	62	2,2	138	6,3
82,3	362	9,1	445	3,1	1.363	19,3	1.055	33,7	37	1,3	46	2,1
27,4	107	2,7	229	1,6	434	6,1	237	7,6	40	1,4	29	1,3
9,14	64	1,6	199	1,4	173	2,4	109	3,5	40	1,4	56	2,5
3,05	44	1,1	124	0,9	97	1,4	39	1,2	27	0,9	24	1,1
1,02	40	1,0	127	0,9	72	1,0	26	0,8	28	1,0	23	1,0
blank (bl.)	40		145		71		31		28		22	



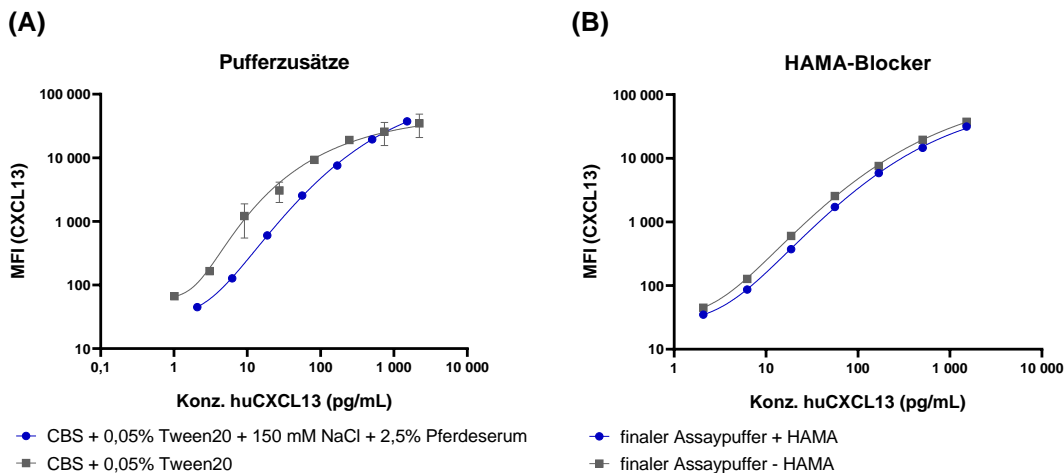


**Abbildung 4-17: STD-Kurven der geeignetsten Antikörperkombinationen für die CXCL13-Detektion.**

Der Vergleich der geeignetsten Antikörperkombinationen erfolgte über die jeweiligen CXCL13-Standardkurven. Dargestellt sind die MFI-Mittelwerte von Duplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Es handelt sich um eine doppelt-logarithmische Darstellung.

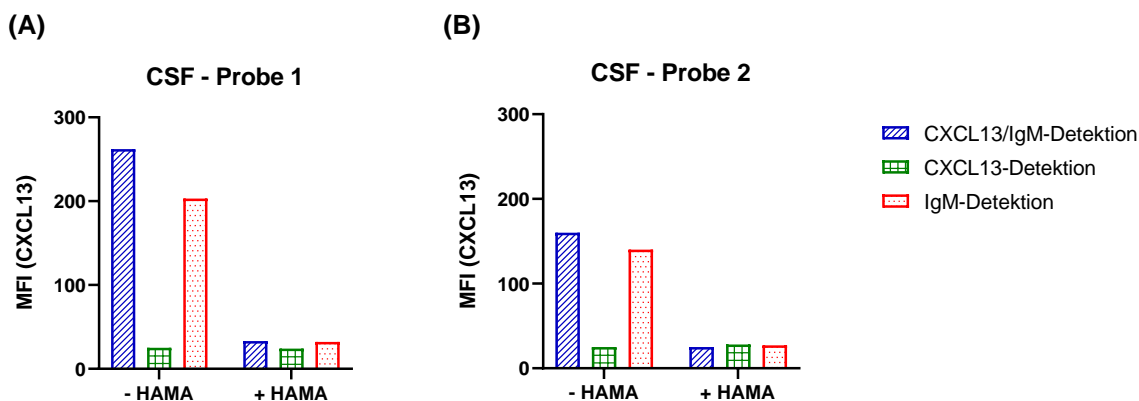
### Pufferauswahl

Die Wahl eines geeigneten Assaypuffers erfolgte ebenfalls über die CXCL13-Standardkurve. Es wurden verschiedene Pufferzusätze, darunter unterschiedliche Tierseren oder -plasmen, getestet. Final wurde ein CBS-Puffer mit 0,05 % Tween20 + 150 mM NaCl + 2,5 % Pferdeserum gewählt. Ein Vergleich mit einem CBST-Puffer ohne NaCl und Pferdeserum ist in der Abbildung 4-18 (A) gezeigt und verdeutlicht die Notwendigkeit der Pufferzusätze. Es wurden sieben STD-Kurvenpunkte mit CXCL13-Konzentrationen von 2.222 pg/mL bis 1,02 pg/mL verglichen. Ohne die Zusätze gab es zum Teil hohe Standardabweichungen zwischen den Duplikaten der einzelnen STD-Kurvenpunkte. Durch die Pufferzusätze konnten die Schwankungen in den MFI-Signalen reduziert werden. Gleichzeitig wurden die Signale durch die Zusätze etwas gedrückt, was jedoch nicht zum einem Verlust der Sensitivität führte. Bei der parallelen Detektion von CXCL13- und IgM-Antikörpern mit dem gewählten Puffer kam es bei zwei CSF-Proben zu einer Kreuzreaktion zwischen dem CXCL13-Fängerantikörper und dem IgM-Detektionssystem (Abbildung 4-19). Bei einer reinen CXCL13-Detektion wurden bei diesen Proben niedrige MFI-Signale gemessen. Sobald die CXCL13-Detektion mit der IgM-Detektion kombiniert wurde, erhöhten sich die Signale für das CXCL13 deutlich. Auch bei einer reinen IgM-Detektion konnten MFI-Signale für das CXCL13 gemessen werden. Dies lag vermutlich an heterophilen Human-Anti-Maus-Antikörpern (HAMAs), welche mit dem immobilisierten ms-a-huCXCL13 Antikörper kreuzreagierten und dann durch den dk-a-huIgM-PE erfasst wurden. Aus diesem Grund wurde zu dem finalen Assaypuffer ein HAMA-Blocker zugegeben. Der Blocker wurde im Verhältnis 1:1000 eingesetzt. Durch den HAMA-Blocker konnte die Kreuzreaktion verhindert werden. Wie in der Abbildung 4-18 (B) gezeigt, hatte die Zugabe des Blockers keine Auswirkung auf den Verlauf der CXCL13-Standardkurve.



**Abbildung 4-18: STD-Kurven des CXCL13 bei unterschiedlichen Pufferbedingungen.**

Die Auswahl eines geeigneten Assaypuffers für den *Borrelia neuroplex* erfolgte über die CXCL13-Standardkurve. In **(A)** wird die STD-Kurve bei einem einfachen CBST-Puffer ohne Zusätze und einem CBST-Puffer mit 150 mM NaCl und 2,5 % Pferdeserum verglichen. In **(B)** wird die STD-Kurve des finalen Puffers mit und ohne HAMA-Blocker verglichen. Dargestellt sind die MFI-Mittelwerte von Duplikaten mit der dazugehörigen Standardabweichung. Es handelt sich um eine doppelt-logarithmische Darstellung.



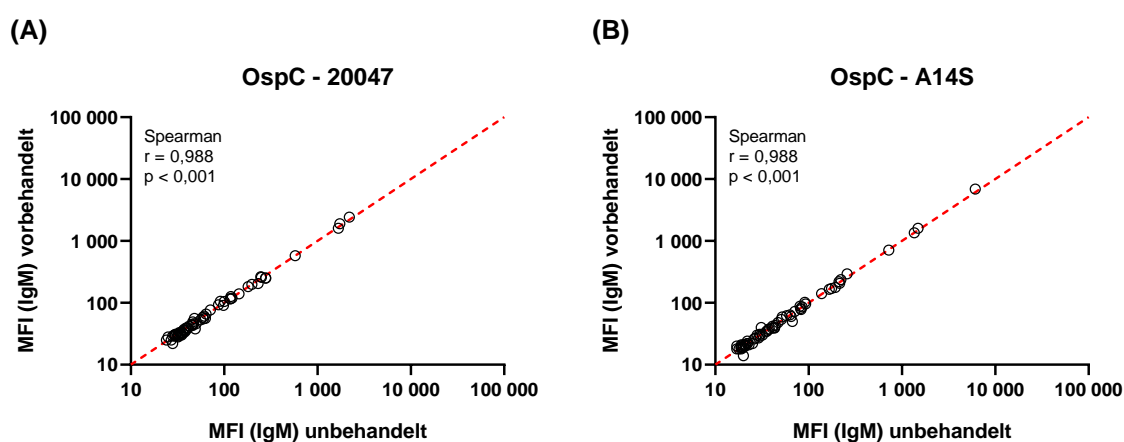
**Abbildung 4-19: Effekt des HAMA-Blockers auf die CXCL13-Detektion.**

Da es bei der parallelen Detektion von CXCL13 und IgM zu einer Kreuzreaktion zwischen dem CXCL13-Fängerantikörper und dem IgM-Detektionssystem kam, musste ein HAMA-Blocker eingesetzt werden. Um den Effekt des Blockers aufzuzeigen, wurden die MFI-Signale des CXCL13 bei einer reinen CXCL13-Detektion, einer reinen IgM-Detektion und einer CXCL13/IgM-Detektion in einem Balkendiagramm betrachtet. Bei den MFI-Signalen handelte es sich um Einfachbestimmungen. Die CSF-Proben wurden 1:10 verdünnt.

### Probenverdünnung

Für CSF-Proben wurde eine Verdünnung von 1:10 gewählt. Serum-Proben wurden 1:1600 verdünnt. Da es bei der IgM-Detektion durch die Anwesenheit von Rheumafaktoren (RFs) zu falsch-positiven MFI-Signalen kommen kann, wurde eine Vorbehandlung der Serum-Proben mit einem RF-Absorbens in Erwägung gezogen. RFs sind hauptsächlich IgM-Autoantikörper, die an IgG-Immunkomplexe binden können. Durch den Einsatz eines RF-Absorbens können bis zu 15 mg/mL IgG-Antikörper und damit auch die gebundenen RFs aus einer Probe entfernt

werden. Somit werden falsch-positive Signale durch RFs, aber auch eine Verdrängung der IgM-Antikörper bei einer zu hohen IgG-Konzentration verhindert. Um die Notwendigkeit eines RF-Absorbens zu untersuchen, wurden 50 Borreliose-negative und 13 Borreliose-positive Proben von Central BioHub einmal vorbehandelt und einmal unbehandelt in Einfachbestimmungen mit dem *Borrelia neuroplex* gemessen. Ein Vergleich der erhaltenen MFI-Werte ist in der Abbildung 4-20 gezeigt. Es wurden nur die MFI-Werte der OspC-Antigene verglichen, da nur diese für die IgM-Detektion verwendet wurden. Bei beiden Antigenen gab es eine sehr starke Korrelation zwischen den MFI-Signalen von vorbehandelten und unbehandelten Proben. Eine Vorbehandlung der Proben schien daher nicht notwendig und es wurde auf den weiteren Einsatz eines RF-Absorbens verzichtet.



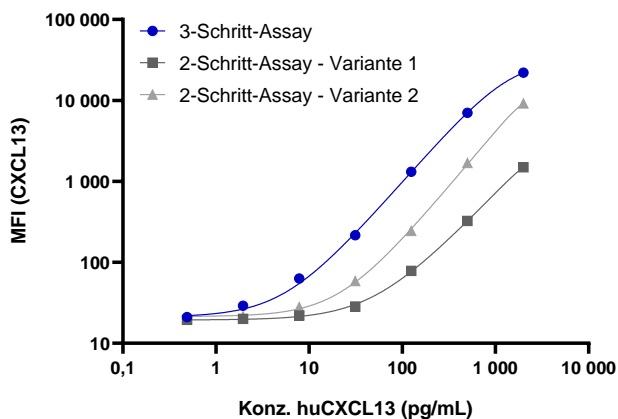
**Abbildung 4-20: Einsatz eines RF-Absorbens bei der Probenverdünnung.**

Um die Notwendigkeit eines RF-Absorbens bei der Probenverdünnung zu untersuchen, wurden 50 Borreliose-negative und 13 Borreliose-positive Proben von Central BioHub in Einfachbestimmungen mit dem *Borrelia neuroplex* gemessen. Die Proben waren einmal unbehandelt und einmal mit einem RF-Absorbens vorbehandelt. Die MFI-Signale der IgM-dominanten OspC-Antigene sind in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Es erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.

### CXCL13/IgM-Detektion

Bei der CXCL13/IgM-Detektion bestand die Herausforderung darin, einen 3-Schritt-Assay (CXCL13-Detektion) mit einem 2-Schritt-Assay (IgM-Detektion) zu kombinieren. Dafür wurde zunächst versucht den 3-Schritt-Assay der CXCL13-Detektion durch Kombination einzelner Assay-Schritte in einen 2-Schritt-Assay umzuwandeln. Anhand der STD-Kurve (2.000 pg/mL - 0,488 pg/mL) wurden zwei verschiedene Varianten getestet (Abbildung 4-21). Bei der ersten Variante wurde der biotinylierte Detektionsantikörper gleichzeitig mit dem PE-konjugierten Streptavidin zugegeben. Bei der zweiten Variante erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers zusammen mit der Zugabe des STD. Als Assaypuffer wurde hier ein

spezieller Puffer der Firma tgcBIOMICS verwendet, welcher final auf Grund einer starken Trübung durch ausgefallene Proteine ausgeschlossen wurde. Der Puffer wurde im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt. Es wurde in Duplikaten gemessen. Bei beiden Varianten des 2-Schritt-Assays konnte gegenüber dem 3-Schritt-Assay ein deutlicher Verlust der Sensitivität beobachtet werden.



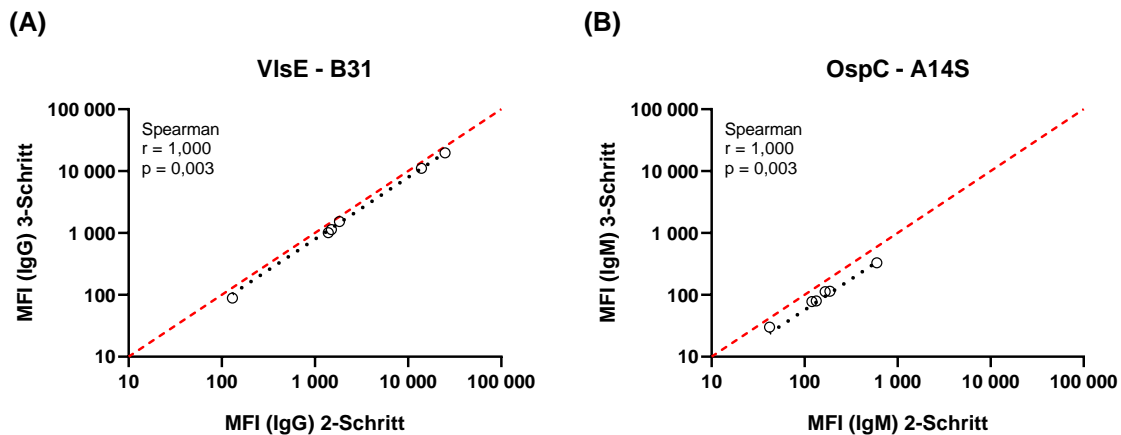
**Abbildung 4-21: STD-Kurven des CXCL13 bei unterschiedlichen Assayformaten.**

Für die kombinierte CXCL13/IgM-Detektion wurde die CXCL13-Standardkurve des 3-Schritt-Assays mit den Standardkurven zwei verschiedener 2-Schritt-Assays verglichen. Die STD-Kurven von 2.000 pg/mL bis 0,488 pg/mL wurden in Duplikaten gemessen. Als Assaypuffer wurde ein mit PBS verdünnter Puffer der Firma tgcBIOMICS verwendet. Dargestellt sind die MFI-Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung. Es handelt sich um eine doppelt-logarithmische Darstellung.

Alternativ sollte der 2-Schritt-Assay der IgM-Detektion zu einem 3-Schritt-Assay erweitert werden. Dazu wurde nach der Probeninkubation ein zusätzlicher Pufferschritt eingebaut, bei dem die Mikrosphären für 1 h in Assaypuffer inkubieren. Der zusätzliche Pufferschritt wurde anhand von sechs Borreliose-positiven Proben aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch getestet. Die Messung der Proben erfolgte in Einfachbestimmungen. Ein Vergleich der MFI-Signale mit den Signalen des klassischen 2-Schritt-Assays ist für die Antigene VlsE - B31 und OspC - A14S in der Abbildung 4-22 gezeigt. Auch bei der IgG-Detektion wurde der zusätzliche Pufferschritt eingebaut, damit die Detektion parallel zur CXCL13/IgM-Detektion auf derselben Assayplatte erfolgen konnte. Die Vergleiche für die anderen Antigene sind im Anhang in der Abbildung 7-30 und der Abbildung 7-31 zu finden. Der zusätzliche Pufferschritt hatte keine Auswirkungen auf die MFI-Signale. Bei allen Antigenen lag eine starke Korrelation der MFI-Signale vor.

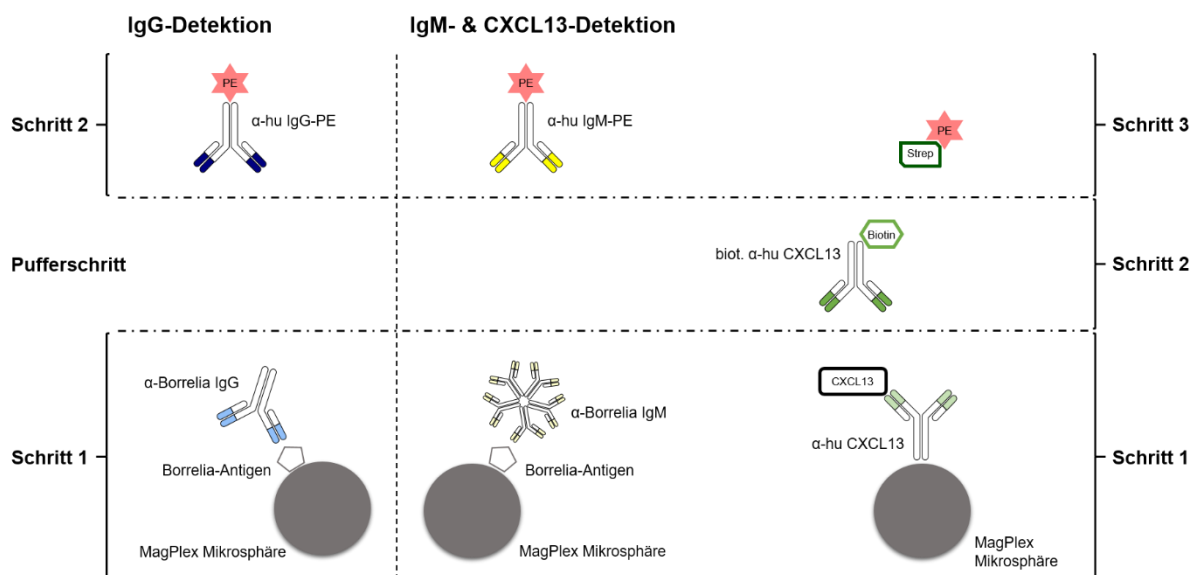
Auf Grund der Ergebnisse wurde für den *Borrelia neuroplex* der in der Abbildung 4-23 gezeigte Assay-Aufbau verwendet. Bei der Messung von CSF-Proben erfolgte eine kombinierte CXCL13/IgM-Detektion. Bei der IgM-Detektion wurde ein zusätzlicher Pufferschritt eingebaut. Für die CXCL13-Detektion wurde bei diesem Schritt der biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben. Die IgG-Detektion im CSF erfolgte separat. Sowohl hier als auch bei der

IgG/IgM-Detektion im Serum wurde ebenfalls ein Pufferschritt eingebaut. Eine CXCL13-Detektion im Serum fand nicht statt.



**Abbildung 4-22: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assayformaten - I.**

Für den Vergleich eines 2-Schritt-Assays und eines 3-Schritt-Assays zur IgG/IgM-Detektion wurden sechs Borreliose-positive Serum-Proben aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch verwendet. Die Proben wurden in Einfachbestimmungen gemessen und die MFI-Signale in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Zudem wurde eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt und eine Korrelationsanalyse nach Spearman vorgenommen. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für das IgG-dominante Antigen VlsE - B31 (**A**) und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S (**B**).



**Abbildung 4-23: Schematische Darstellung des Borrelia neuroplex.**

Der Borrelia neuroplex wird verwendet, um IgG- und IgM-Antikörper in Serum und CSF nachzuweisen. Zudem kann mit dem Borrelia neuroplex das Chemokin CXCL13 im CSF quantitativ detektiert werden. Die Detektion des CXCL13 erfolgt in Kombination mit der IgM-Detektion. Dafür wird ein 3-Schritt-Assay mit einem zusätzlichen Pufferschritt bei der IgM-Detektion verwendet. Die IgG-Detektion erfolgt separat mit einem 2-Schritt-Assay, der ebenfalls durch einen Pufferschritt erweitert ist. Auch bei der IgG/IgM-Detektion im Serum wird der erweiterte 2-Schritt-Assay verwendet. Die Detektion beider Antikörperklassen erfolgt separat.

### 4.3.2 technische Assay-Validierung

Die technische Validierung des *Borrelia neuroplex* fand parallel zur technischen Validierung des *Borrelia multiplex* (siehe 4.2.2 technische Assay-Validierung (*Borrelia multiplex*)) statt. Neben der Standardabweichung und dem Variationskoeffizienten wurde die Wiederfindungsrate als statistisches Maß verwendet. Sie wird in Prozent angegeben und berechnet sich aus dem Verhältnis eines Istwerts zum Sollwert.

Für die Serum-Validierung wurden dieselben Serum-Validierungsproben wie für den *Borrelia multiplex* verwendet. Die CSF-Validierung erfolgte mit sechs *Borreliose*-positiven CSF-Proben von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Zudem wurde auf jeder Validierungsplatte die CXCL13-Standardkurve in Triplikaten gemessen.

#### Detektionsgrenze (Limit of Detection = LOD)

Für die Bestimmung der Detektionsgrenze (LOD) wurde der Assaypuffer des *Borrelia neuroplex* in 21 Replikaten auf einer Assayplatte gemessen. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Für die einzelnen *Borrelia*-Antigene wurde der LOD wie bei der technischen Validierung des *Borrelia multiplex* berechnet. Die LODs sind in der Tabelle 4-11 aufgeführt.

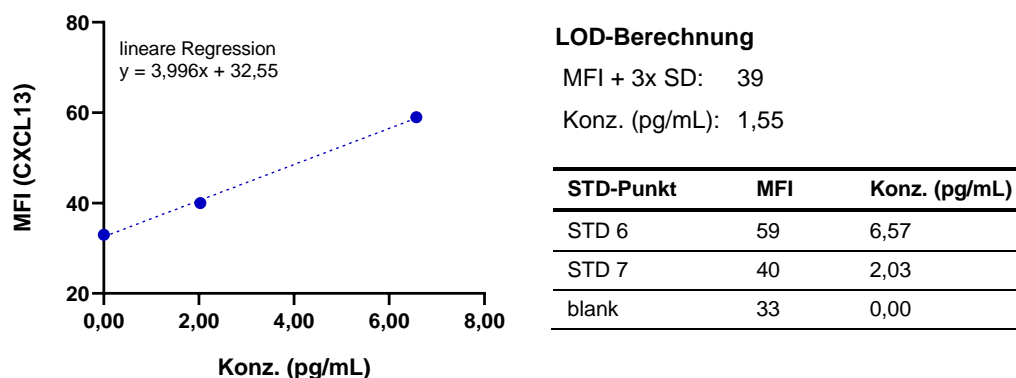
**Tabelle 4-11: Detektionsgrenzen (LODs) der *Borrelia*-Antigene im *Borrelia neuroplex*.**

Für die Bestimmung der Detektionsgrenze (LOD) wurde der Assaypuffer des *Borrelia multiplex* in 21 Replikaten gemessen. Für jedes Antigen wurde eine LOD aus dem Mittelwert und dreimal der Standardabweichung berechnet.

Antikörper- antwort	Antigen	LOD (Mittelwert + 3x SD)
IgG	VlsE - B31	71
	BmpA - PKo	39
	DbpA - ZS7	48
	DbpA - 20047	46
	DbpA - PKo	53
	DbpA - A14S	35
	DbpA - PBi	60
	p83/100 - PKo	39
	OppA-2 - PBi	52
IgM	OspC - 20047	31
	OspC - A14S	36

Der LOD des CXCL13 wurde als Konzentration angegeben. Dafür wurde der MFI-Mittelwert aus den 21 Replikaten sowie die MFI-Mittelwerte der letzten beiden STD-Kurvenpunkte in ein Punktediagramm eingetragen und über die lineare Regression die Regressionsgerade ermittelt. Über die Gleichung der Geraden wurde mit dem Mittelwert der Replikate und dreimal der SD die Konzentration des LOD berechnet. Die Regressionsgerade und die dazugehörige

Geradengleichung sind in der Abbildung 4-24 gezeigt. Der LOD des CXCL13 lag bei einer Konzentration von 1,55 pg/mL.



**Abbildung 4-24: Regressionsgerade zur LOD-Berechnung für die CXCL13-Detektion im Borrelia neuroplex.**

Für die LOD-Berechnung des CXCL13 wurde der MFI-Mittelwert der 21 Replikate (blank) sowie die Mittelwerte der beiden untersten STD-Kurvenpunkte benötigt. Die Werte wurden in ein Punktdiagramm eingetragen und über die lineare Regression die Regressionsgerade ermittelt. Für die LOD-Berechnung wurde dann die Gleichung der Geraden verwendet. Die Berechnung erfolgte über den MFI-Mittelwert der Replikate und die dreifache SD.

#### **untere Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification = LLOQ)**

Für die Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde der vierte STD-Kurvenpunkt der CXCL13-Standardkurve an drei aufeinander folgenden Tagen in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 gemessen. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten. Mit Hilfe des Bio-Plex Manager (Version 6.2) wurde dann über die STD-Kurve die CXCL13-Konzentration der einzelnen Verdünnungen berechnet. Aus den Konzentrationen der Triplikate wurde der Mittelwert und der %CV bestimmt. Die Mittelwerte wurden anschließend mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert und die Wiederfindungsrate (%) im Vergleich zur nominalen Konzentration des vierten STD-Kurvenpunkts (56,1 pg/mL) berechnet. Die rückgerechneten Konzentrationen sowie der %CV der Triplikate und die Wiederfindungsrate (%) sind für alle drei Messungen in der Tabelle 4-12 aufgeführt. Da bei den Verdünnungen von 1:128 und 1:256 keine Rückrechnung auf die Konzentration möglich war, sind diese Verdünnungsstufen nicht in der Tabelle enthalten. Die untere Bestimmungsgrenze wurde über die Verdünnungsstufe definiert, bei der die Wiederfindungsrate noch zwischen 80 % und 120 % lag und der %CV nicht größer als 25 % war. Dies war bei einer Verdünnung von 1:16 der Fall. Die untere Bestimmungsgrenze entsprach somit der nominalen Konzentration des vierten STD-Kurvenpunkts dividiert durch den Faktor 16 und lag bei einer Konzentration von 3,51 pg/mL.

Da der unterste Punkt der STD-Kurve bei 2,08 pg/mL lag, konnten zwar auch geringere Konzentrationen berechnet werden. Die Konzentrationsbestimmung galt dann jedoch als nicht ausreichend präzise.

**Tabelle 4-12: Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (LLOQ) des CXCL13 im Borrelia neuroplex.**

Für die Ermittlung der unteren Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde der vierte STD-Kurvenpunkt der CXCL13-Standardkurve in einer seriellen Verdünnung von 1:2 bis 1:256 gemessen. Die Messung erfolgte in Triplikaten an drei aufeinander folgenden Tagen. Über die Standardkurve wurden die CXCL13-Konzentrationen der Triplikate bestimmt. Dann wurde der Mittelwert sowie der %CV der Triplikate berechnet. Der Mittelwert wurde weiter mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert und über den Vergleich der rückgerechneten Konzentrationen mit der nominalen Konzentration des vierten STD-Kurvenpunkts die Wiederfindungsrate (%) bestimmt. Nur bei einer Wiederfindungsrate zwischen 80 % und 120 % und einem %CV unter 25 % wurde von einer präzisen Ermittlung der Konzentration ausgegangen. Die Festsetzung des LLOQ erfolgte über die letztmögliche Verdünnungsstufe. Die nominale Konzentration des vierten STD-Kurvenpunkts wurde dafür durch den entsprechenden Verdünnungsfaktor dividiert.

Verdünnung STD 4 (56,1 pg/mL)	Messung 1			Messung 2			Messung 3		
	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	%CV	Wiederfindung (%)	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	%CV	Wiederfindung (%)	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	%CV	Wiederfindung (%)
1:2	54,5	3,5	97,1	54,2	2,5	96,6	57,8	2,1	103,0
1:4	55,5	5,0	98,9	55,1	2,6	98,2	53,3	2,5	94,9
1:8	49,9	4,9	88,9	53,5	7,7	95,4	56,2	7,1	100,2
1:16	57,4	21,2	102,3	55,1	13,1	98,3	53,4	17,4	95,2
1:32	53,9	32,5	96,0	51,4	46,7	91,6	50,9	33,0	90,7
1:64	21,1	na	37,6	na	na	na	35,2	na	62,7



### obere Bestimmungsgrenze (Upper Limit of Quantification = ULOQ)

Für die Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) wurden die drei höchsten STD-Kurvenpunkte der CXCL13-Standardkurve über zehn Platten betrachtet und aus den rückgerechneten Konzentrationen der Mittelwert sowie der %CV berechnet. Über den Vergleich der rückgerechneten mittleren Konzentration mit der nominalen Konzentration des jeweiligen STD-Kurvenpunkts wurde die Wiederfindungsrate (%) ermittelt. Als ULOQ wurde die Konzentration des STD-Kurvenpunkts verwendet, bei dem die Wiederfindungsrate noch zwischen 80 % und 120 % lag und der %CV unter 25 % war. Dies war auch noch bei dem obersten STD-Kurvenpunkt der Fall (Tabelle 4-13). Der ULOQ wurde daraufhin nicht auf eine Konzentration festgesetzt, sondern bei jeder Messung über die rückgerechnete Konzentration des ersten STD-Kurvenpunkts definiert.

**Tabelle 4-13: Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) des CXCL13 im *Borrelia neuroplex*.**

Für die Ermittlung der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) wurden die drei höchsten STD-Kurvenpunkte der CXCL13-Standardkurve über zehn Platten betrachtet. Aus den rückgerechneten Konzentrationen der Kurvenpunkte wurde der Mittelwert und der %CV berechnet. Die Mittelwerte wurden dann mit der nominalen Konzentration des jeweiligen STD-Kurvenpunkts verglichen und so die Wiederfindungsrate (%) bestimmt. Für die Bestimmung des ULOQ musste die Wiederfindungsrate (%) zwischen 80 % und 120 % liegen und der %CV durfte nicht unter 25 % sein.

STD-Punkt	nom. Konz. (pg/mL)	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	%CV	Wiederfindung (%)
STD 1	1.515	1.527	0,6	100,8
STD 2	505	498	0,9	98,6
STD 3	168	170	0,9	100,9

### Intra-assay Präzision

Die Intra-assay Präzision wurde sowohl für die IgG/IgM-Detektion im CSF und Serum, als auch für die CXCL13-Detektion im CSF bestimmt. Zur Bestimmung wurden alle Serum-Validierungsproben sowie die CSF-Validierungsproben 1 - 4 in 12 Replikaten gemessen. Für die IgG/IgM-Detektion wurde aus den MFI-Signalen der Replikate der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. Tabelle 4-14 zeigt für jedes Antigen die Mittelwerte der %CVs der entsprechenden Validierungsproben. Unabhängig von der Proben-Matrix konnte bei allen Antigenen eine Intra-assay Präzision von unter 10 % ermittelt werden. Für die CXCL13-Detektion wurde der %CV der über die CXCL13-Standardkurve berechneten Konzentrationen betrachtet. Die CSF-Validierungsproben 3 und 4 konnten hier nicht verwendet werden, da die berechneten Konzentrationen unterhalb des LLOQ lagen. Der Mittelwert der %CVs der CSF-Validierungsproben 1 und 2 lag bei 5,4 %.

**Tabelle 4-14: Intra-assay Präzision der IgG/IgM-Detektion des Borrelia neuroplex.**

Zur Bestimmung der Intra-assay Präzision für die IgG/IgM-Detektion des Borrelia neuroplex wurden alle vier Serum/CSF-Validierungsproben in 12 Replikaten gemessen. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. In der Tabelle ist ein Mittelwert aus den %CVs der einzelnen Validierungsproben angegeben.

Antikörper- antwort	Antigen	Intra-assay Präzision (%CV)	
		CSF	Serum
IgG	VlsE - B31	1,9	1,7
	BmpA - PKo	2,8	3,1
	DbpA - ZS7	4,7	4,0
	DbpA - 20047	3,5	3,9
	DbpA - PKo	4,0	3,5
	DbpA - A14S	2,9	3,6
	DbpA - PBi	4,0	5,5
	p83/100 - PKo	4,5	4,7
	OppA-2 - PBi	1,9	2,6
IgM	OspC - 20047	6,1	3,4
	OspC - A14S	5,4	3,4

### Inter-assay Präzision

**Tabelle 4-15: Inter-assay Präzision der IgG/IgM-Detektion des Borrelia neuroplex.**

Zur Bestimmung der Inter-assay Präzision für die IgG/IgM-Detektion des Borrelia neuroplex wurden die in Triplikaten gemessenen QC-Proben (CSF oder Serum) verwendet. Für die Inter-assay Präzision im CSF wurden zehn Läufe verwendet. Die Bestimmung im Serum erfolgte über fünf Läufe. Aus den MFI-Signalen der Replikate wurde der %CV berechnet. Dieser sollte nicht über 20 % liegen. In der Tabelle ist ein Mittelwert aus den %CVs der einzelnen QC-Proben angegeben.

Antikörper- antwort	Antigen	Inter-assay Präzision (%CV)	
		CSF	Serum
IgG	VlsE - B31	3,4	4,8
	BmpA - PKo	4,9	3,9
	DbpA - ZS7	5,8	5,7
	DbpA - 20047	5,0	4,1
	DbpA - PKo	5,6	3,4
	DbpA - A14S	5,5	5,2
	DbpA - PBi	8,1	5,2
	p83/100 - PKo	10,4	9,4
	OppA-2 - PBi	3,5	3,7
IgM	OspC - 20047	8,1	4,5
	OspC - A14S	7,2	5,5

Auch die Inter-assay Präzision wurde sowohl für die IgG/IgM-Detektion im CSF und Serum als auch für die CXCL13-Detektion im CSF bestimmt. Für die Bestimmung wurden die in jedem Assay mitgeführten QC-Proben (CSF oder Serum) verwendet. Für die IgG/IgM- sowie die CXCL13-Detektion im CSF wurden die in Triplikaten gemessenen Proben von zehn Läufen

verwendet. Für die IgG/IgM-Detektion im Serum erfolgte die Bestimmung über fünf Läufe. Auch hier wurden die Proben in Triplikaten gemessen. In der Tabelle 4-15 ist für jedes Antigen der Mittelwert der berechneten %CVs aller Proben aufgeführt. Auch hier sollte dieser unter 20 % liegen. Bei allen Antigenen konnte unabhängig von der Probenmatrix eine Inter-assay Präzision von unter 10,5 % ermittelt werden. Für die Inter-assay Präzision der CXCL13-Detektion wurde wieder der %CV der über die CXCL13-Standardkurve berechneten Konzentrationen betrachtet. Der Mittelwert der %CVs lag bei 11,5 %.

### Spike-in Wiederfindung

Für die Untersuchung der Spike-in Wiederfindung wurden die CSF-Validierungsproben 5 und 6, bei welchen die natürliche CXCL13-Konzentration unterhalb des LLOQ lag, mit dem rekombinanten CXCL13 der STD-Kurve versetzt (spike-in) und durch eine serielle Verdünnung jeweils drei Proben mit unterschiedlicher CXCL13 Konzentration (high, medium, low) generiert. Die Proben wurden dann in Triplikaten gemessen und über die STD-Kurve und die CXCL13-Konzentration berechnet. Aus den Konzentrationen der Triplikate wurde der Mittelwert bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen mussten anschließend noch durch Subtraktion der natürlichen CXCL13-Konzentration in den Proben (unspiked) korrigiert werden. Die Wiederfindungsrate (%) wurde über den Vergleich mit der ursprünglich erwarteten CXCL13-Konzentration ermittelt. Die berechneten und die korrigierten Konzentrationen sind zusammen mit der Wiederfindungsrate (%) in der Tabelle 4-16 (CSF-Validierungsprobe 5) und der Tabelle 4-17 (CSF-Validierungsprobe 6) aufgeführt. Die Wiederfindungsrate lag durchschnittlich bei 62,9 %. Demnach konnten etwa 60 % des eingespiketen CXCL13 in der Probe detektiert werden.

#### Tabelle 4-16: Spike-in Wiederfindung der CXCL13-Detektion - CSF-Validierungsprobe 5.

Für die Untersuchung der Spike-in Wiederfindung wurde die CSF-Validierungsprobe 5 mit einer CXCL13-Konzentration unterhalb des LLOQ verwendet. Die Probe wurde mit rekombinantem CXCL13 versetzt (spike-in). Anschließend wurde die Probe seriell verdünnt und in Triplikaten gemessen. Über die CXCL13-Standardkurve wurden die Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen (high, medium, low) ermittelt. Der Mittelwert der entsprechenden Konzentrationen wurde durch Subtraktion der natürlichen CXCL13-Konzentration der Probe (unspiked) korrigiert und die Wiederfindungsrate (%) im Vergleich zur ursprünglich erwarteten CXCL13-Konzentration bestimmt.

Spike-in	erwartete Konz. (pg/mL)	ermittelte Konz. (pg/mL)	korrigierte Konz. (pg/mL)	Wiederfindung (%)
high	500,00	333,00	331,01	66,2
medium	50,00	32,99	31,00	62,0
low	6,25	6,04	4,05	64,7
unspiked	-	1,99	0,00	-

**Tabelle 4-17: Spike-in Wiederfindung der CXCL13-Detektion - CSF-Validierungsprobe 6.**

Für die Untersuchung der Spike-in Wiederfindung wurde die CSF-Validierungsprobe 6 mit einer CXCL13-Konzentration unterhalb des LLOQ verwendet. Die Probe wurde mit rekombinantem CXCL13 versetzt (spike-in). Anschließend wurde die Probe seriell verdünnt und in Triplikaten gemessen. Über die CXCL13-Standardkurve wurden die Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen (high, medium, low) ermittelt. Der Mittelwert der entsprechenden Konzentrationen wurde durch Subtraktion der natürlichen CXCL13-Konzentration der Probe (unspiked) korrigiert und die Wiederfindungsrate (%) im Vergleich zur ursprünglich erwarteten CXCL13-Konzentration bestimmt.

<b>Spike-in</b>	<b>erwartete Konz. (pg/mL)</b>	<b>ermittelte Konz. (pg/mL)</b>	<b>korrigierte Konz. (pg/mL)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>
high	500,00	303,37	301,66	60,3
medium	50,00	32,96	31,25	62,5
low	6,25	5,57	3,87	61,9
unspiked	-	1,70	0,00	-

### Verdünnungslinearität

**Tabelle 4-18: CXCL13-Verdünnungslinearität im Borrelia neuroplex.**

Um die CXCL13-Verdünnungslinearität zu untersuchen, wurde die CSF-Validierungsprobe 5 mit rekombinantem CXCL13 versetzt und eine serielle Verdünnungsreihe angelegt. Jede Verdünnungsstufe wurde in Triplikaten gemessen. Aus den ermittelten CXCL13-Konzentrationen der Triplikate wurde der Mittelwert bestimmt und dieser mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den rückgerechneten Konzentrationen aller Verdünnungen wurde dann ebenfalls der Mittelwert berechnet und über einen Vergleich der Konzentrationen mit diesem die Wiederfindungsrate (%) bestimmt.

<b>Verdünnung</b>	<b>rückgerechnete Konz. (pg/mL)</b>	<b>Wiederfindung (%)</b>
1:4	3.063	96,8
1:8	3.093	97,8
1:16	3.135	99,1
1:32	3.151	99,6
1:64	3.155	99,7
1:128	3.130	98,9
1:256	3.106	98,2
1:512	3.478	109,9
Mittelwert	3.164	-

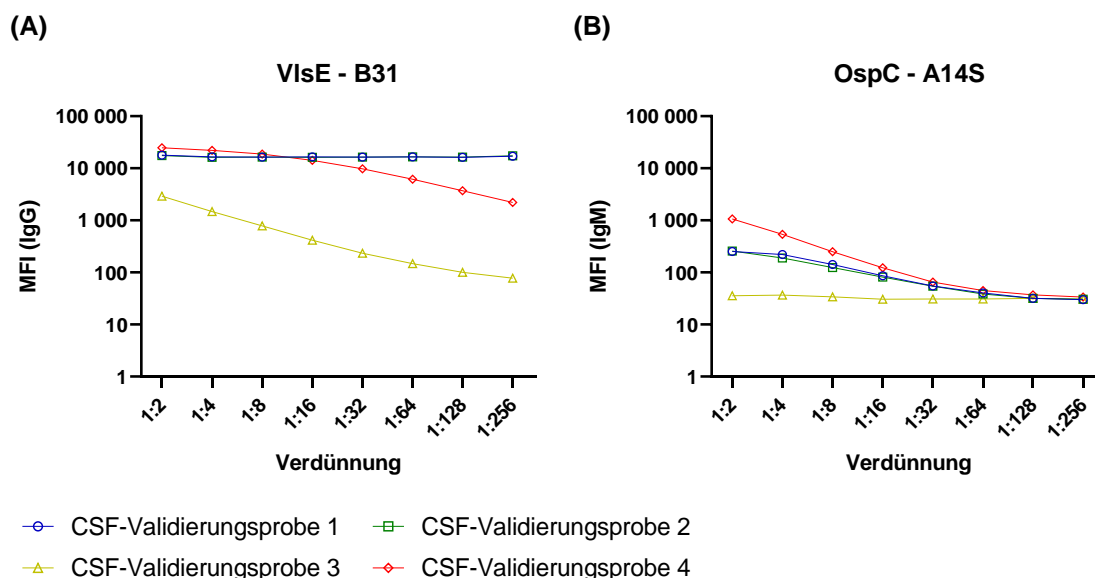
Um die Verdünnungslinearität bei der CXCL13-Detektion zu betrachten, wurde die CSF-Validierungsprobe 5 mit rekombinantem CXCL13 versetzt. Mit 4.000 pg/mL wurde eine CXCL13-Konzentration über dem ULOQ gewählt. Von der Probe wurde dann eine serielle Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1:2) angelegt und diese in Triplikaten gemessen. Aus den über STD-Kurve berechneten Konzentrationen der Triplikate wurde der Mittelwert gebildet und dieser mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den rückgerechneten Konzentrationen aller Verdünnungen wurde ebenfalls der Mittelwert berechnet. Die Wiederfindungsrate (%) für die einzelnen Verdünnungen (Tabelle 4-18) wurde über den Vergleich der rückgerechneten Konzentrationen mit diesem Wert bestimmt. Bei einer

optimalen Verdünnungslinearität sollte die Wiederfindungsrate zwischen 80 % und 120 % liegen.

## Parallelität der Probenverdünnung

### CSF-Proben

Um die Parallelität der CSF-Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die CSF-Validierungsproben 1 - 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 in Triplikaten gemessen. Aus den MFI-Signalen der IgG/IgM-Detektion wurden jeweils der Mittelwert, die SD und der %CV berechnet. Der %CV sollte unter 20 % liegen. Die erhaltenen Verdünnungskurven der einzelnen CSF-Validierungsproben sind in der Abbildung 4-25 für die Antigene VisE - B31 und OspC - A14S gezeigt. Die Verdünnungskurven für die anderen Antigene sind im Anhang in der Abbildung 7-32 und der Abbildung 7-33 zu finden. Für jede Verdünnung wurde der Mittelwert der Triplikate verwendet. Die dazugehörigen SDs wurden ebenfalls eingezeichnet, sind auf Grund ihrer geringen Werte jedoch nicht erkennbar. Bei allen Verdünnung lag der %CV unter 20 %. Die Parallelität der Verdünnung unterschied sich von Probe zu Probe und war auch für die einzelnen Antigene nicht immer gleich. So lag bei den CSF-Validierungsproben 3 und 4 vor allem bei einer niedrigeren Verdünnung eine Parallelität vor. Bei einer höheren Verdünnung gab es häufig keine Parallelität in der Probenverdünnung. Bei den CSF-Validierungsproben 1 und 2 dagegen zeigte sich eine Parallelität vor allem bei höheren Verdünnungen.



**Abbildung 4-25: Parallelität der CSF-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - I.**

Um die Parallelität der CSF-Probenverdünnung bei der IgG/IgM-Detektion im Borrelia neuroplex zu untersuchen, wurden die CSF-Validierungsproben 1 - 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für das IgG-dominante Antigen VisE - B31 (A) und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S (B). Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.

Die Parallelität bei der CXCL13-Detektion wurde nur bei den CSF-Validierungsproben 1 und 2 betrachtet, da bei den beiden anderen Proben die ermittelten Konzentrationen zum Teil unterhalb des LLOQ lagen. Aus den ermittelten Konzentrationen der Triplikate wurde der Mittelwert berechnet und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Wiederfindungsrate (%) wurde wie bei der Verdünnungslinearität über den Vergleich der rückgerechneten Konzentrationen mit dem Mittelwert dieser bestimmt (Tabelle 4-19). Bei einer Parallelität der Probenverdünnung sollte die Wiederfindungsrate (%) zwischen 80 % und 120 % liegen. So zeigte sich bei der CSF-Validierungsprobe 1 ab einer 1:4 Verdünnung eine Parallelität. Bei der CSF-Validierungsprobe 2 dagegen lag eine Parallelität nur bei einer niedrigen Verdünnung von 1:4 bis 1:32 vor.

**Tabelle 4-19: Parallelität der CSF-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex (CXCL13-Detektion).**

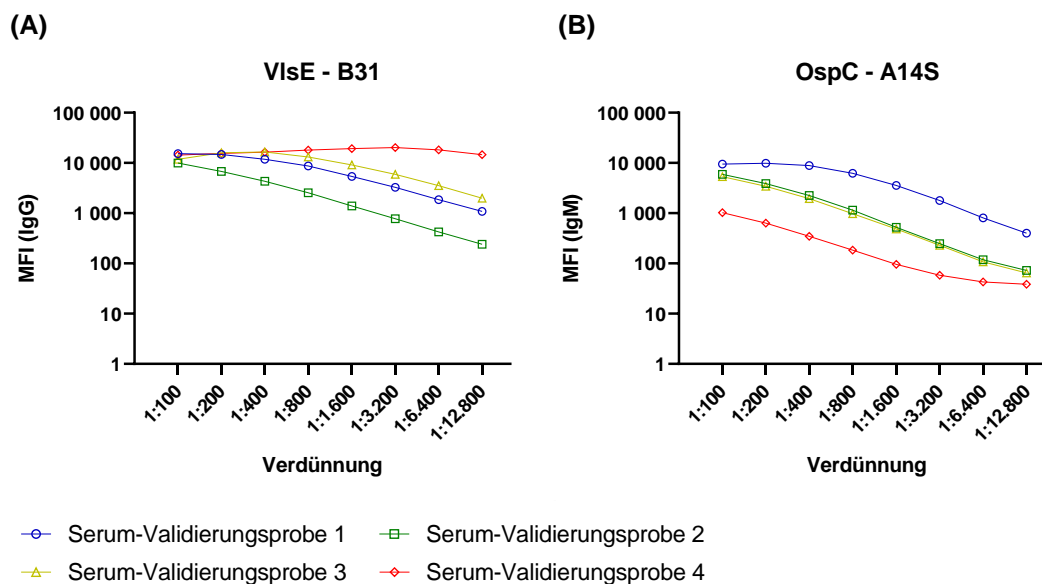
Um die Parallelität der CSF-Probenverdünnung bei der CXCL13-Detektion im Borrelia neuroplex zu untersuchen, wurden die in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 gemessenen CSF-Validierungsproben 1 und 2 verwendet. Jede Verdünnung wurde in Triplikaten gemessen und aus den ermittelten Konzentrationen der Mittelwert berechnet. Dieser wurde dann mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus den rückgerechneten Konzentrationen wurde erneut der Mittelwert berechnet. Die Wiederfindungsrate (%) wurde über den Vergleich der einzelnen Konzentrationen mit dem zuletzt berechneten Mittelwert bestimmt und sollte zwischen 80 % und 120 % liegen.

Verdünnung	CSF-Validierungsprobe 1		CSF-Validierungsprobe 2	
	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	Wiederfindung (%)	rückgerechnete Konz. (pg/mL)	Wiederfindung (%)
1:2	5.131	120,7	524	91,3
1:4	4.009	94,3	551	95,9
1:8	3.769	88,7	542	94,3
1:16	3.716	87,4	594	103,4
1:32	3.882	91,4	661	115,1
1:64	4.083	96,1	791	137,7
1:128	4.346	102,3	922	160,4
1:256	5.058	119,0	1.135	197,5
Mittelwert	4.249	-	575	-

### Serum-Proben

Um die Parallelität der Serum-Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die Serum-Validierungsproben 1 - 4 verwendet. Die Proben wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 in Triplikaten gemessen. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurde der Mittelwert, die SD und der %CV berechnet. Der %CV sollte nicht über 20 % liegen. Die Verdünnungskurven der einzelnen Serum-Validierungsproben sind in der Abbildung 4-26 für die Antigene VlsE - B31 und OspC - A14S gezeigt. Die Verdünnungskurven für die anderen Antigene sind im Anhang in der Abbildung 7-34 und der Abbildung 7-35 zu finden. Der %CV lag bei allen Triplikaten unter 20 %. Auch hier unterschied sich die Parallelität der Verdünnung

von Probe zu Probe und Antigen zu Antigen. So lag bei einigen Proben eine Parallelität erst ab einer höheren Verdünnung vor. Bei anderen Proben dagegen war eine Parallelität nur bei niedrigen Verdünnungen vorhanden. Die meisten Proben zeigten eine Parallelität der Probenverdünnung im Bereich von 1:400 - 1:3.200. In diesem liegt auch der für die Probenverdünnung im *Borrelia neuroplex* gewählte Verdünnungsfaktor von 1:1.600.



**Abbildung 4-26: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im *Borrelia neuroplex* - I.**

Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die Serum-Validierungsproben 1 - 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für das IgG-dominante Antigen VisE - B31 (A) und das IgM-dominante Antigen OspC - A14S (B). Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.

### Gefrierzyklus-Stabilität

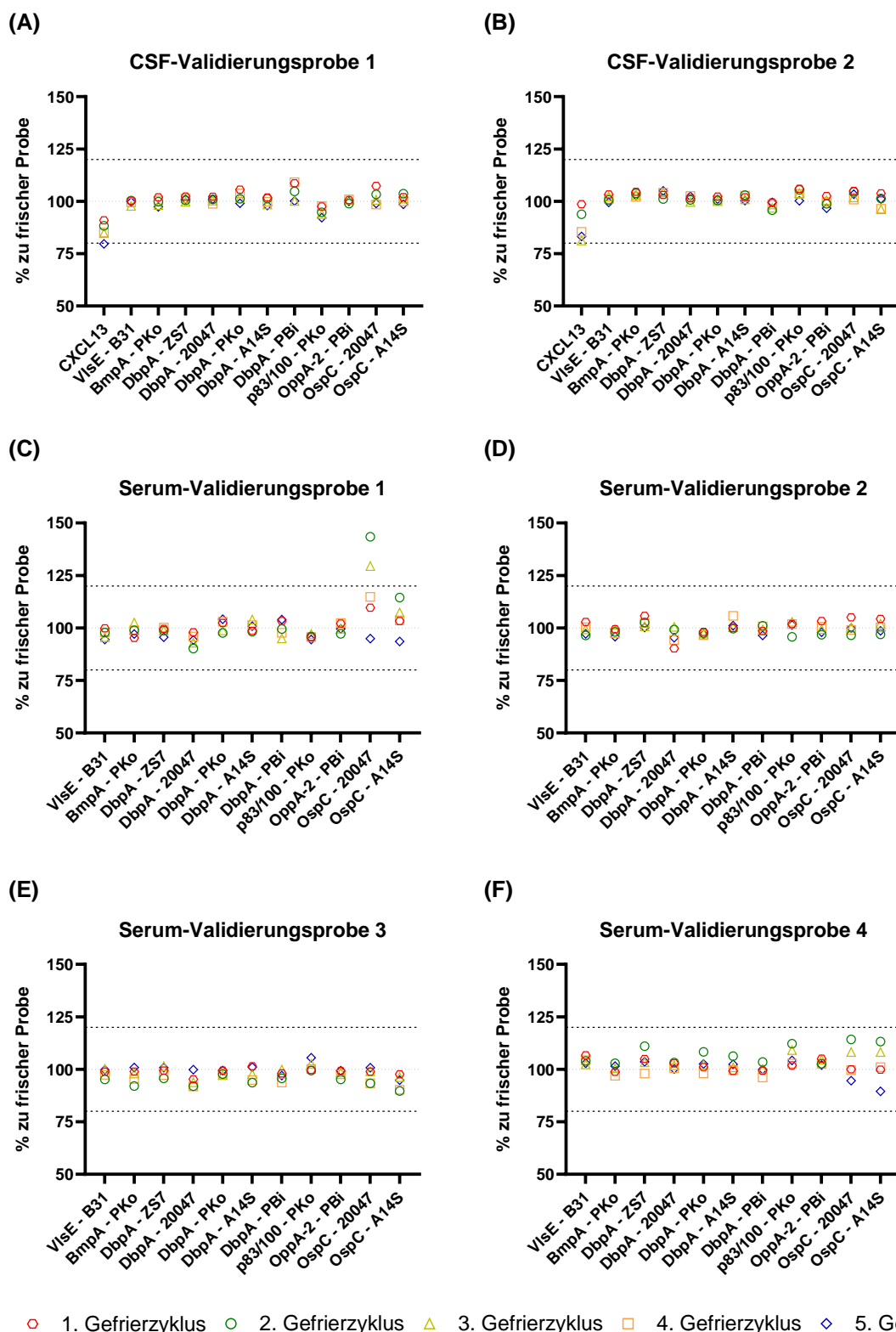
Die Betrachtung der Gefrierzyklus-Stabilität erfolgte anhand der CSF-Validierungsproben 1 und 2 (CSF-Stabilität) sowie der Serum-Validierungsproben 1 - 4 (Serum-Stabilität). Von jeder Validierungsprobe wurden Aliquots mit unterschiedlichen Gefrierzyklen in Triplikaten gemessen. Als Referenz wurden Aliquots ohne Gefrierzyklus verwendet. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurden der Mittelwert und der %CV (sollte nicht über 20 % liegen) berechnet. Die Mittelwerte für die einzelnen Gefrierzyklen wurden prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen. Die Abweichung sollte nicht mehr als 20 % betragen, so dass Werte im Bereich von 80 - 120 % toleriert wurden. Das Ergebnis für die CSF-Validierungsproben ist in der Abbildung 4-27 (A-B) gezeigt. Bei den *Borrelia*-Antigenen lagen alle Prozentwerte zwischen 90 % und 110 %. Ein mehrmaliges Auftauen der Probe hatte keine Auswirkungen auf die Stabilität der zu detektierenden Antikörper. Beim CXCL13 dagegen konnte eine Abnahme der Stabilität bei mehrfachem Auftauen beobachtet werden. Während bei dem 1. und 2. Gefrierzyklus noch Prozentwert von 88 % oder höher erzielt wurden, sanken die Werte ab dem 3. Gefrierzyklus vor allem bei der CSF-Validierungsprobe

2 deutlich und lagen bei  $\leq 85\%$ . Die Proben sollten daher im Idealfall nicht mehr als 2x, jedoch auf keinen Fall 5x, aufgetaut werden. Abbildung 4-27 (C-F) zeigt das Ergebnis für die Serum-Validierungsproben. Bei nahezu allen Validierungsproben konnte für jedes Antigen ein Wert zwischen 90 % und 115 % ermittelt werden. Lediglich bei der Serum-Validierungsprobe 1 lagen die Werte des 2. und 3. Gefrierzyklus bei dem Antigen OspC - 20047 über 120 %. Da bei allen anderen Antigenen die Werte für den 2. und 3. Gefrierzyklus im tolerierten Bereich lagen und auch der Wert des 5. Gefrierzyklus im tolerierten Bereich war, wurde ein Messfehler vermutet. Auf Grund der geringen Abweichung zur Referenz ist davon auszugehen, dass ein Auftauen und wieder Einfrieren der Proben bis zu fünfmal möglich ist.

### **Kurzzeit- und Temperaturstabilität**

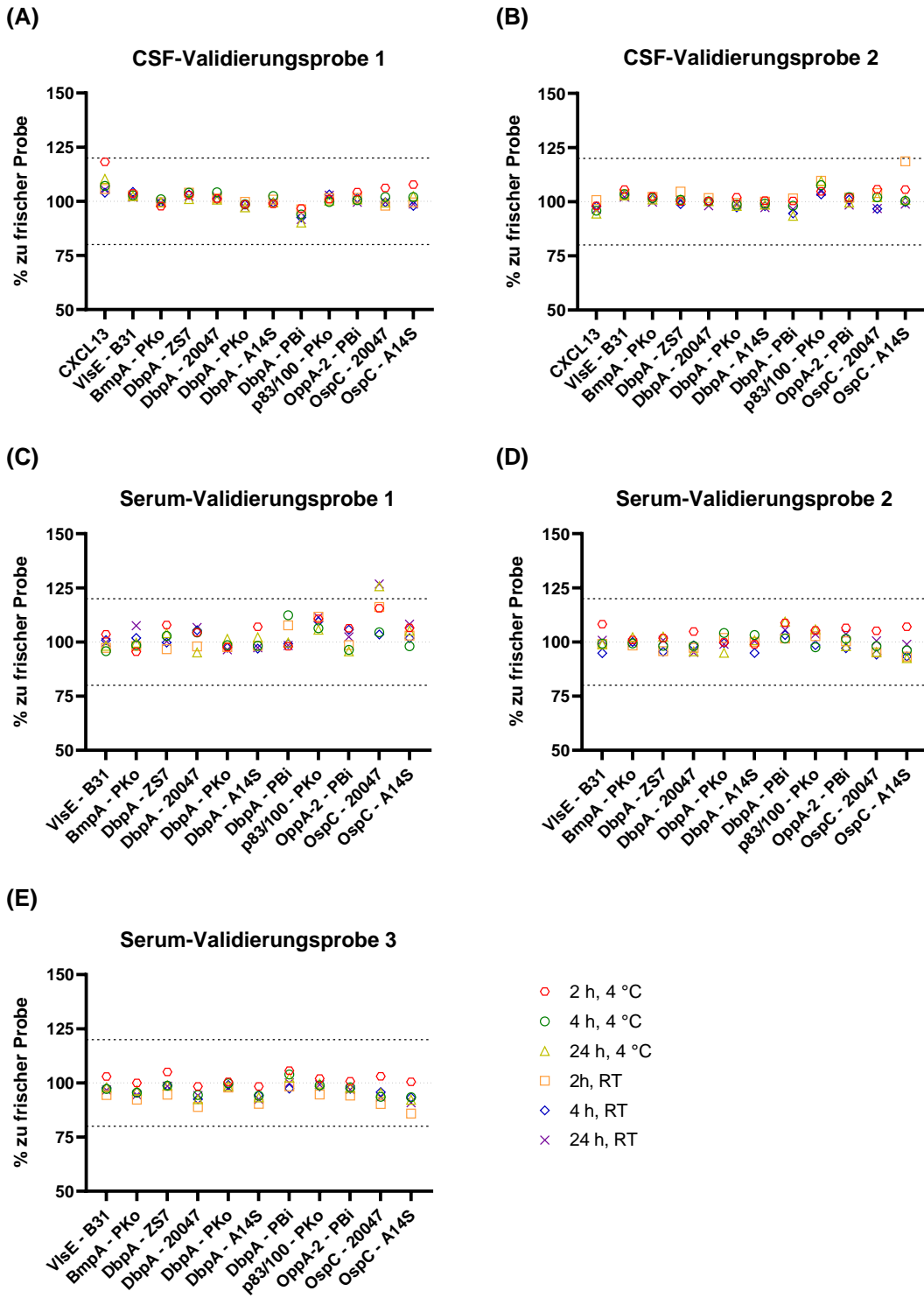
Für die Betrachtung der Kurzzeit- und Temperaturstabilität wurden von den CSF-Validierungsproben 1 und 2 (CSF-Stabilität) und den Serum-Validierungsproben 1 - 3 (Serum-Stabilität) mehrere Aliquots bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) über verschiedene Zeiträume (2 h, 4 h, 24 h) gelagert. Die Aliquots wurden anschließend in Triplikaten gemessen. Als Referenz wurde jeweils ein bei -80 °C gelagertes Aliquot frisch aufgetaut. Aus den MFI-Signalen wurde der Mittelwert und der %CV berechnet. Auch hier sollte der %CV nicht über 20% liegen. Die Mittelwerte wurden dann mit dem Mittelwert der entsprechenden Referenz verglichen. Das Ergebnis für die CSF-Validierungsproben ist in Abbildung 4-28 (A-B) gezeigt. Bei den *Borrelia*-Antigenen lagen alle Prozentwerte zwischen 90 % und 120 % und waren somit im tolerierten Bereich von 80 % bis 120 %. Auch beim CXCL13 lagen alle Werte im tolerierten Bereich. Eine kurzfristige Lagerung der CSF-Proben bei 4 °C oder RT schien demnach keine Auswirkungen auf die Stabilität der Proben zu haben. In Abbildung 4-28 (C-E) ist das Ergebnis für die Serum-Validierungsproben 1 - 3 zu finden. Bei den Serum-Validierungsproben 2 und 3 lagen alle Prozentwerte zwischen 90 % und 110 %. Bei der Serum-Validierungsprobe 1 dagegen waren die Prozentwerte zum Teil auch höher. Die Werte für eine Lagerung bei 4 °C oder RT für 24 h lagen hier bei dem Antigen OspC - 20047 außerhalb des tolerierten Bereichs. Dies könnte ein Hinweis sein, dass eine längere Lagerung bei diesen Temperaturen zu Problemen bei der IgM-Detektion führen kann.





**Abbildung 4-27: Gefrierzyklus-Stabilität im *Borrelia neuroplex*.**

Um die Gefrierzyklus-Stabilität zu untersuchen, wurden Aliquots der CSF-Validierungsproben 1 und 2 sowie aller Serum-Validierungsproben 1-5-mal aufgetaut und wieder eingefroren. Die Aliquots wurden dann in Triplikaten gemessen. Als Referenz wurde jeweils ein Aliquot ohne Gefrierzyklus verwendet. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurde der Mittelwert berechnet und die Mittelwerte für die unterschiedlichen Gefrierzyklen prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen.



**Abbildung 4-28: Kurzzeit- und Temperaturstabilität von Proben im *Borrelia neuroplex*.**

Um die Kurzzeit- und Temperaturstabilität zu untersuchen, wurden Aliquots der CSF-Validierungsproben 1 und 2 sowie der Serum-Validierungsproben 1 - 3 bei 4 °C oder Raumtemperatur (RT) über unterschiedliche Zeiträume (2 h, 4 h, 24 h) gelagert und anschließend in Triplikaten gemessen. Als Referenz wurde jeweils ein bei -80 °C gelagertes Aliquot frisch aufgetaut. Aus den MFI-Signalen der Triplikate wurde ein Mittelwert berechnet und die Mittelwerte für die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen prozentual mit dem Mittelwert der Referenz verglichen.

### 4.3.3 klinische Assay-Validierung

#### Cut-off - Bestimmung - CSF

Um die Grenzwerte (cut offs) für die *Borrelia*-Antigene festzusetzen und einen Grenzwert für die Unterscheidung von normalen und erhöhten CXCL13-Konzentrationen zu finden, wurden 115 CSF-Proben aus der Biobank des DZNE & Hertie-Instituts für klinische Hirnforschung in Einfachbestimmungen gemessen. Die Proben hatten keine Borreliose-Diagnostik und wurden als negative Proben verwendet. CSF-Proben mit einem positiven Borreliose-Befund waren nicht vorhanden.

#### IgM/IgG-Detektion

Da keine eindeutig positiven Borreliose-Proben zur Verfügung standen, konnte die cut off - Bestimmung nicht über ROC-Analysen erfolgen. Es wurde daher wie folgt vorgegangen. Zunächst wurden bei jedem Antigen Ausreißer in den MFI-Signalen ermittelt und diese aus dem Datensatz entfernt. Mit dem reduzierten Datensatz erfolgte dann für jedes Antigen die Berechnung des Mittelwerts und der SD. Als cut off wurde der Mittelwert plus 6x die SD festgelegt. Die cut offs der einzelnen Antigene sind in der Tabelle 4-20 aufgeführt. Wie auch beim *Borrelia* multiplex, wurden die Antigene DbpA - ZS7, DbpA - A14S und DbpA - PBi bei der Probenklassifizierung nicht benötigt, so dass für diese Antigene kein cut off bestimmt wurde.

**Tabelle 4-20: Cut offs der *Borrelia*-Antigene bei CSF-Proben im *Borrelia* neuroplex.**

Die cut off - Bestimmung für die *Borrelia*-Antigene im *Borrelia* neuroplex erfolgte für CSF-Proben über den jeweiligen Mittelwert der MFI-Signale und 6x die SD. Vor der Bestimmung wurde Ausreißer in den MFI-Signalen ermittelt und aus dem Datensatz entfernt.

Antikörperantwort	Antigen	cut off (Mittelwert + 6x SD)
IgG	VisE - B31	239
	BmpA - PKo	73
	DbpA - 20047	104
	DbpA - PKo	90
	p83/100 - PKo	98
	OppA-2 - PBi	277
IgM	OspC - 20047	47
	OspC - A14S	54

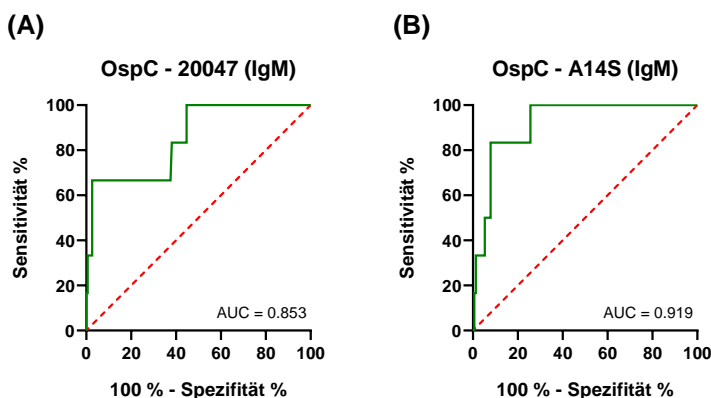
#### CXCL13-Detektion

Auch bei der Festsetzung eines CXCL13-Grenzwerts wurden zunächst die MFI-Signale verwendet. Wie auch bei der cut off - Bestimmung für die Antigene wurden Ausreißer in den MFI-Signalen ermittelt und aus dem Datensatz entfernt. Anschließend wurde auch hier der Mittelwert der übrigen MFI-Signale sowie die SD ermittelt. Für den Mittelwert plus 6x die SD

wurde über die CXCL13-Standardkurve die CXCL13-Konzentration bestimmt. Da die verwendeten CSF-Proben auf zwei Platten mit jeweils einer STD-Kurve gemessen wurden, erfolgte auch die Bestimmung der CXCL13-Konzentration über beide Kurve. Abschließend wurde der Mittelwert der beiden CXCL13-Konzentrationen als Grenzwert verwendet. Unter Berücksichtigung der 1:10 Probenverdünnung ergab sich ein CXCL13-Grenzwert von 69,6 pg/mL.

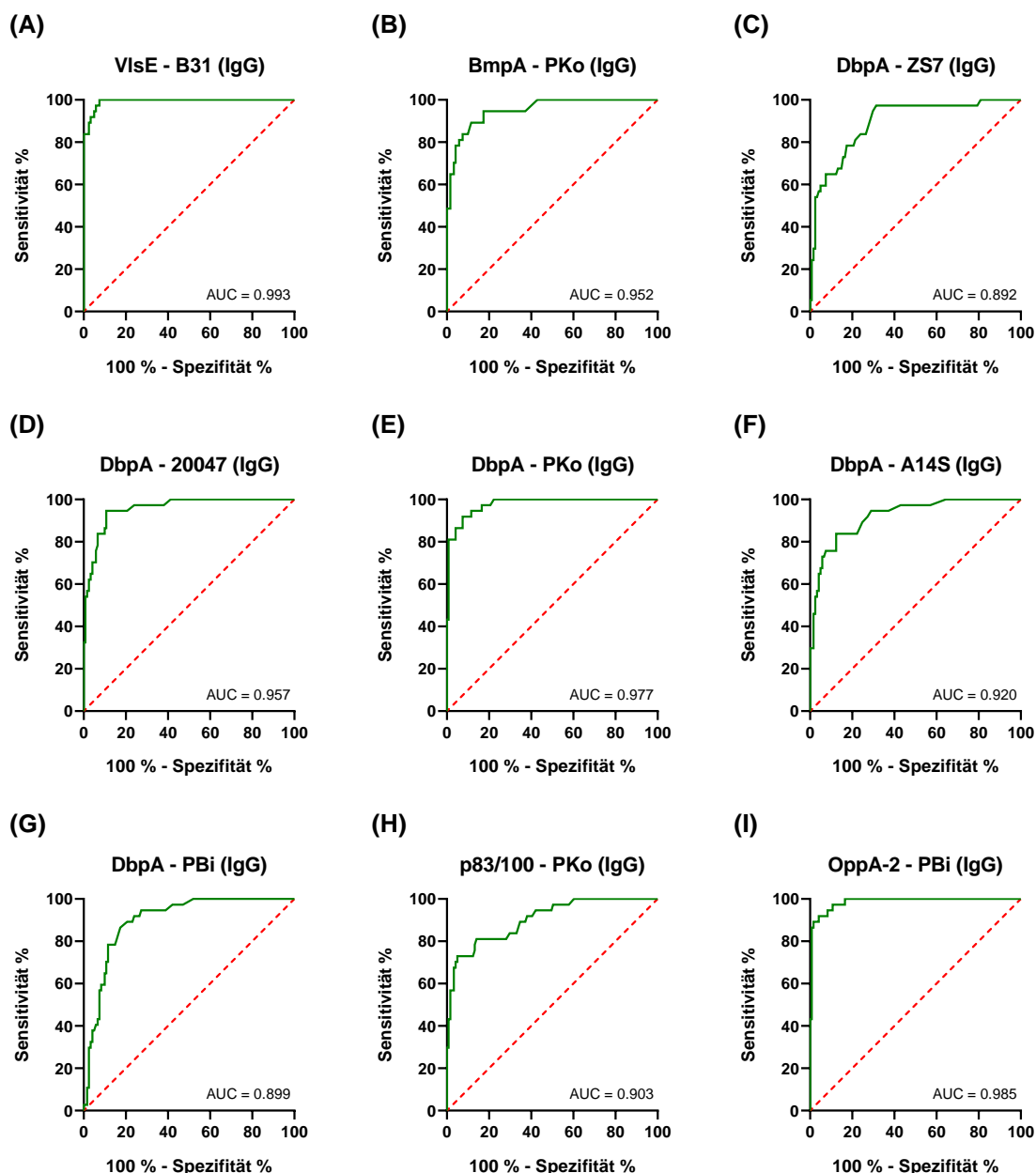
### Cut off - Bestimmung - Serum

Um die cut offs für die *Borrelia*-Antigene bei Serum-Proben zu bestimmen, wurden 172 Proben der MEMO-Studie verwendet. Die Proben wurden, wie auch bei der cut off - Bestimmung für den Borrelia multiplex, zusätzlich mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 analysiert. Basierend auf dem Ergebnis wurden die Proben in IgG/IgM-negativ und IgG/IgM-positiv unterteilt und Proben mit einem unklaren Ergebnis (IgG/IgM-borderline, n = 14) ausgeschlossen. Nach der Unterteilung wurde mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia neuroplex ROC-Analysen durchgeführt. Die Analysen für die IgM-dominanten OspC-Antigene sind in der Abbildung 4-29 zu finden. Die Analysen für die IgG-dominanten Antigene befinden sich in der Abbildung 4-30. Mit dem Ergebnis aus den Analysen wurde für die bereits bei der Probenklassifizierung im Borrelia multiplex verwendeten Antigene ein cut off festgelegt. Bei den Antigene DbpA - ZS7, DbpA - A14S und DbpA - PBi wurde erneut kein cut off benötigt. Die cut off - Werte wurden so festgelegt, dass bei fast allen Antigenen eine Spezifität von 95 % oder mehr erreicht wurde. Lediglich bei dem Antigen OspC - A14S musste der cut off so gewählt werden, dass nur eine Spezifität von etwa 88 % vorlag.



**Abbildung 4-29: ROC-Analysen - IgM-dominante Antigene des Borrelia neuroplex.**

Für die ROC-Analysen wurden 158 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie verwendet. Die Analysen erfolgten mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia neuroplex. Die Einteilung der Proben in IgM-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgM 2.0 der Firma Mikrogen. 152 Proben waren IgM-negativ und 6 Proben IgM-positiv. Als Maß für die Qualität der Klassifizierung wurde bei jedem Antigen der AUC-Wert berechnet.

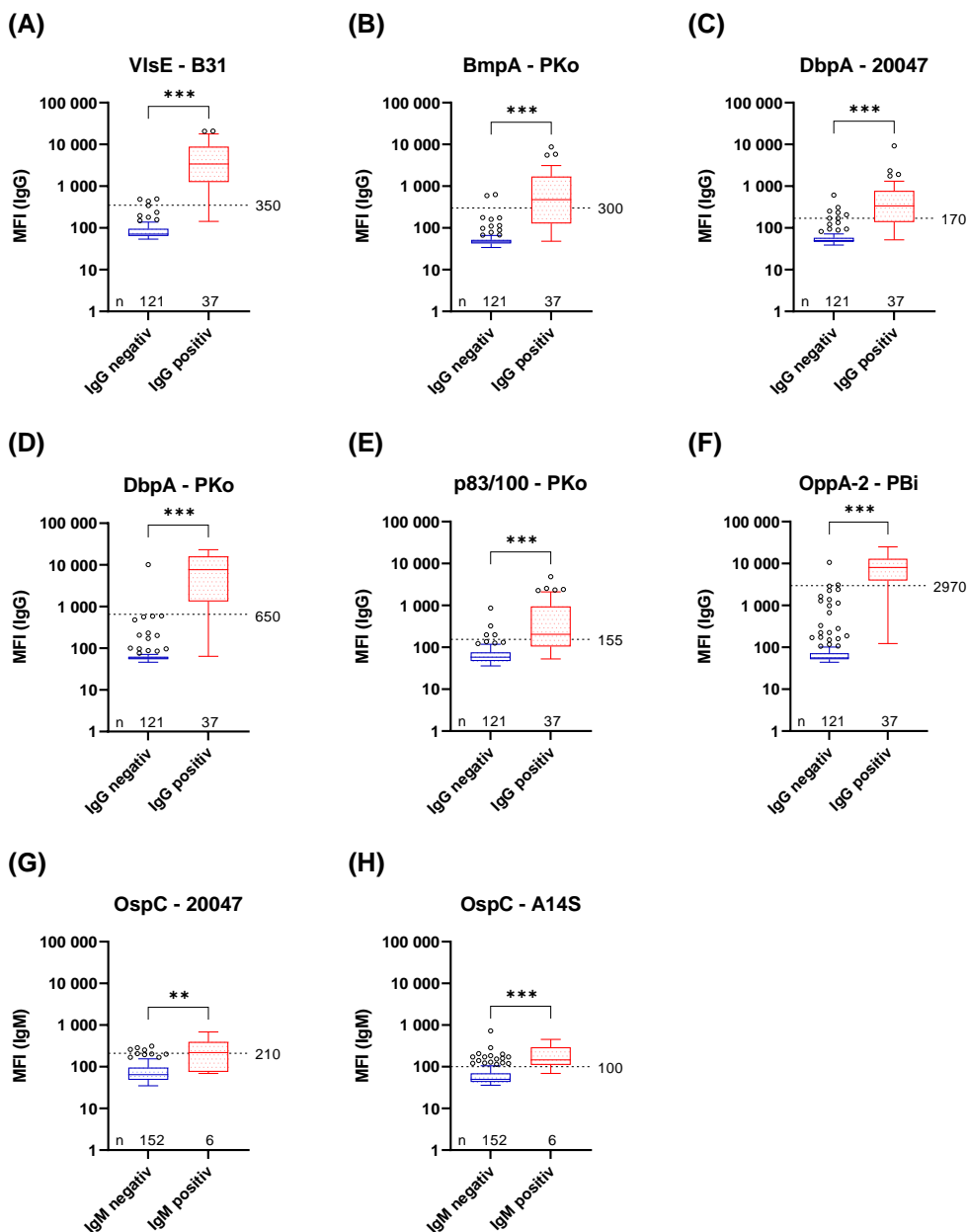


**Abbildung 4-30: ROC-Analysen - IgG-dominante Antigene des Borrelia neuroplex.**

Für die ROC-Analysen wurden 158 Serum-Proben aus der deutschen MEMO-Studie verwendet. Die Analysen erfolgten mit den MFI-Signalen aus dem Borrelia neuroplex. Die Einteilung der Proben in IgG-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG 2.0 der Firma Mikrogen. 121 Proben waren IgG-negativ und 37 Proben IgG-positiv. Als Maß für die Qualität der Klassifizierung wurde bei jedem Antigen der AUC-Wert berechnet.

### **IgG/IgM-Probenklassifizierung**

In der Abbildung 4-31 ist für jedes Antigen mit einem cut off die Verteilung der MFI-Signale bei den IgG/IgM-negativen und IgG/IgM-positiven Proben in einem Box-Whisker-Plot graphisch dargestellt. Die festgesetzten cut off - Werte sind als gestrichelte Linie eingezeichnet.



**Abbildung 4-31: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale der MEMO-Proben im Borrelia neuroplex.**

Mit den Box-Whisker-Plots wurde die Verteilung der MFI-Signale aus dem Borrelia neuroplex von 158 Serum-Proben der deutschen MEMO-Studie graphisch dargestellt. Die Einteilung der Proben in IgG/IgM-negativ und -positiv basierte auf einer Messung der Proben mit dem kommerziellen Borreliose-Test recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0 der Firma Mikrogen. Die Box-Whisker-Plots der IgG-dominanten Antigene befinden sich in **(A-F)**. Die Plots der IgM-dominanten Antigene sind **(G-H)**. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Sofern vorhanden, sind die festgesetzten Grenzwerte (cut offs) durch eine gestrichelte Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*).

Wie auch beim Borrelia multiplex konnte bei allen Antigenen ein signifikanter Unterschied zwischen den negativen und positiven Proben festgestellt werden, wobei die Unterschiede bei

einigen Antigenen geringer als bei anderen waren (z. B. OppA-2 - PBi vs. OspC - 20047). Zudem gab es auch hier bei allen Antigenen Ausreißer, die als Punkte außerhalb der Antennen eingezeichnet sind. Dies bestätigte noch einmal, dass eine korrekte Probenklassifizierung nur durch eine Kombination mehrerer Antigene erreicht werden kann.

Die IgG/IgM-Probenklassifizierung erfolgte wie bei dem *Borrelia multiplex*. Der Klassifizierungsprozess ist im Abschnitt 4.2.3 klinische Assay-Validierung (*Borrelia multiplex*) unter dem Punkt „Probenklassifizierung“ beschrieben. Es wurden jedoch keine cut off - Proben, sondern fixe cut off - Werte verwendet.

#### 4.3.4 Assay-Präzision

Eine Aussage über die Genauigkeit des *Borrelia neuroplex* war nur für die IgG/IgM-Detektion im Serum möglich, da nur Borreliose-negative und -positive Serum-Proben und keine CSF-Proben zur Verfügung standen. Die Genauigkeit des Assays wurde über den Vergleich mit dem kommerziellen Test recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 bestimmt. Es wurden dieselben Proben wie für die klinische Validierung verwendet. Beide Antikörperklassen wurden sowohl einzeln als auch kombiniert betrachtet. Die berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten sind in der Tabelle 4-21 aufgeführt. Es ergab sich eine IgG/IgM-Sensitivität von 94,9 % (95%CI 83,1-99,1 %) und eine IgG/IgM-Spezifität von 93,0 % (95%CI 87,2 - 96,3 %).

**Tabelle 4-21: Sensitivität und Spezifität der IgG/IgM-Detektion des *Borrelia neuroplex* bei Serum-Proben.**

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität der IgG/IgM-Detektion des *Borrelia neuroplex* bei Serum-Proben wurden 158 Proben der MEMO-Studie verwendet. Die Berechnung erfolgte im Vergleich zum kommerziellen Test recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 und wurde sowohl für beide Antikörperklasse separat als auch kombiniert durchgeführt. Die in Klammern angegebenen Konfidenzintervalle (95%CI) wurden nach Wilson/Brown berechnet.

Klassifizierung	Sensitivität	Spezifität
<b>IgG/IgM</b>	recomBead <i>Borrelia</i> positiv: 39 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig positiv: 37 - Sens.: 94,9 % (83,1 - 99,1 %) - PPV: 80,4 %  <b>Cohen's Kappa</b> : 0,823 (95%CI 0,724 - 0,923)	recomBead <i>Borrelia</i> negativ: 119 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig negativ: 110 - Spez.: 93,0 % (87,2 - 96,3 %) - NPV: 98,2 %
<b>IgG</b>	recomBead <i>Borrelia</i> positiv: 37 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig positiv: 36 - Sens.: 97,3 % (86,2 - 99,9 %) - PPV: 92,3 %  <b>Cohen's Kappa</b> : 0,931 (95%CI 0,864 - 0,998)	recomBead <i>Borrelia</i> negativ: 121 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig negativ: 118 - Spez.: 97,5 % (93,0 - 99,3 %) - NPV: 99,2 %
<b>IgM</b>	recomBead <i>Borrelia</i> positiv: 6 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig positiv: 4 - Sens.: 66,67 % (30,0 - 94,1 %) - PPV: 50,0 %  <b>Cohen's Kappa</b> : 0,552 (95%CI 0,233 - 0,871)	recomBead <i>Borrelia</i> negativ: 152 <i>Borrelia multiplex</i> : - richtig negativ: 148 - Spez. 97,4 % (93,4 - 99,0 %) - NPV: 98,7 %

### 4.3.5 Messung von CSF/Serum-Paaren

#### CSF/Serum-Paare der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm

Von der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm wurden insgesamt 19 CSF/Serum-Paare mit dem *Borrelia neuroplex* analysiert. Zehn der CSF/Serum-Paare stammten von Patienten mit einer nachgewiesenen Neuroborreliose. Neun Probenpaare waren von Patienten ohne Infektion. Die Ergebnisse des *Borrelia neuroplex* sowie die von der Neurobiobank übermittelten Werte sind in der Tabelle 4-22 zu finden.

#### CXCL13-Quantifizierung

Bei allen CSF-Proben von Patienten mit einer Neuroborreliose konnten erhöhte CXCL13-Konzentrationen gemessen werden. Bei vier Proben lagen die Konzentrationen über dem ULOQ. Bei den anderen Proben (außer CSF-Probe 4) waren die gemessenen Konzentrationen in etwa doppelt so hoch wie von der Neurobiobank des Universitätsklinikums angegeben. Auch bei einigen CSF-Proben von Patienten ohne Neuroborreliose wurden erhöhte CXCL13-Konzentrationen festgestellt.

#### IgG/IgM-Detektion

Alle CSF-Proben der Patienten mit Neuroborreliose wurden im *Borrelia neuroplex* IgG- und IgM-positiv getestet. Die meisten der dazugehörigen Serum-Proben waren ebenfalls IgG- und IgM-positiv. Lediglich die Serum-Proben 3 und 10 waren IgG-negativ. Zudem waren die Serum-Proben 1 und 9 IgM-negativ. Bei den Serum-Proben der Patienten ohne Neuroborreliose konnten keinen Borrelien-spezifischen Antikörper detektiert werden. Bei der CSF-Probe 18 lag jedoch sowohl eine IgG- als auch eine IgM-Positivität vor.

#### Borrelien-spezifischer Liquor/Serum-Antikörperindex (AI)

Um Festzustellen, ob die im CSF nachgewiesenen Antikörper intrathekal gebildet wurden, wurden die Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindizes (AIs) der einzelnen CSF/Serum-Paare mit der Reiber-Methode berechnet. Bei allen Neuroborreliose-Patienten konnten bei einer Betrachtung der IgG-Antikörper AI-Werte  $> 1,5$  festgestellt werden. Auch die Neurobiobank des Universitätsklinikums übermittelte entsprechende AI-Werte, wobei sich die Werte in ihrer Höhe zum Teil deutlich von den AI-Werten im *Borrelia neuroplex* unterschieden. Solche Unterschiede fanden sich auch bei der Betrachtung der IgM-Antikörper. Hier konnten nicht bei allen Patienten AI-Werte  $> 1,5$  festgestellt werden und es lag nicht immer eine Übereinstimmung mit der Neurobiobank des Universitätsklinikums vor. So wurde z.B. bei Patient 2 ein AI von 8,6 übermittelt und somit eine intrathekale Antikörpersynthese diagnostiziert. Mit dem *Borrelia neuroplex* wurde bei diesem Patienten ein AI von 1,1 berechnet, was gegen eine intrathekale Antikörpersynthese spricht.



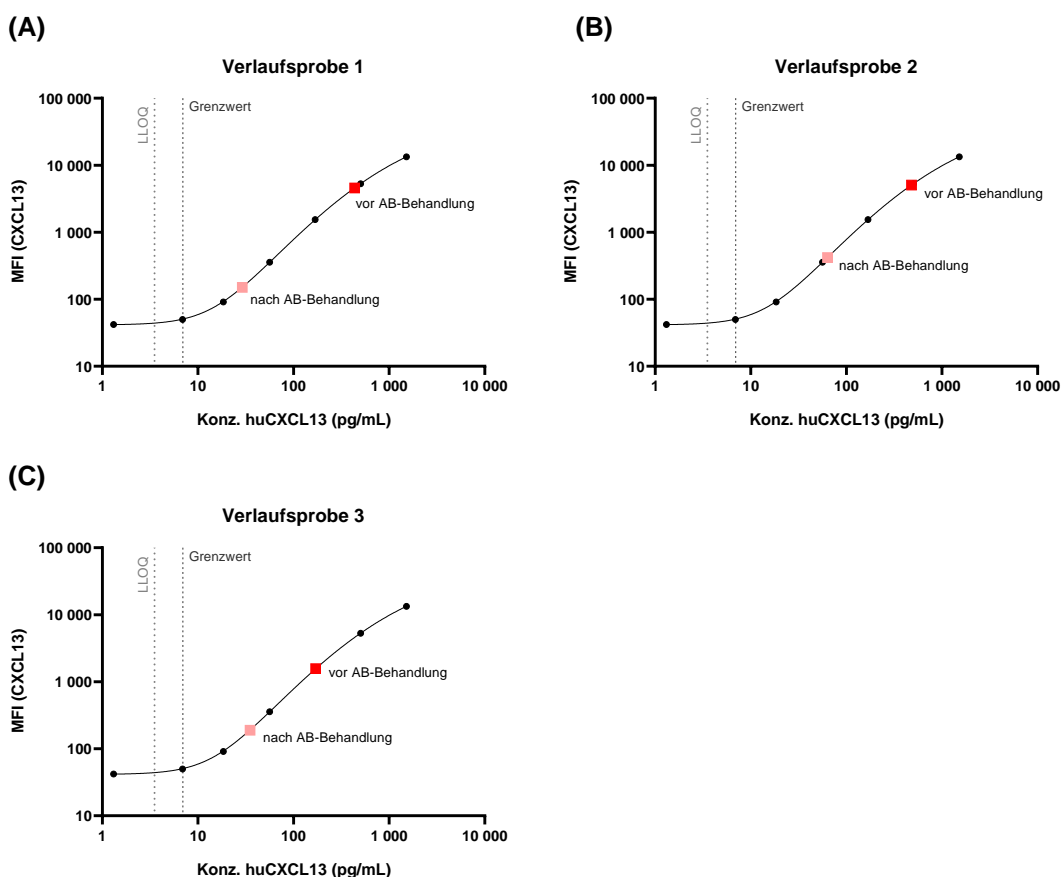
**Tabelle 4-22: Messung von CSF/Serum-Paaren der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm.**

Von der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm wurden 10 CSF/Serum-Paare von Patienten mit einer diagnostizierten Neuroborreliose (NB) und 9 CSF/Serum-Paare von Patienten ohne Neuroborreliose mit dem Borrelia neuroplex analysiert. Neben der IgG/IgM-Klassifizierung wurde der Borrelien-spezifische Liquor/Serum-Antikörperindex berechnet und die CXCL13-Konzentration in den CSF-Proben bestimmt.

Patient	Status	Neurobiobank			Borrelia neuroplex							
		CXCL13 (pg/mL)	IgG - AI	IgM - AI	CXCL13 (pg/mL)	CSF	Serum	AI	CSF	Serum	AI	
1	NB positiv	12.100	8,4	1,4	53.982	> ULOQ	positiv	positiv	3,3	positiv	negativ	2,6
2	NB positiv	17.200	95,5	8,6	34.297	> ULOQ	positiv	positiv	6,7	positiv	positiv	1,1
3	NB positiv	595	3,8	8,0	1.245	erhöht	positiv	negativ	3,4	positiv	positiv	17,8
4	NB positiv	3.226	7,9	3,5	279	erhöht	positiv	positiv	3,2	positiv	positiv	14,8
5	NB positiv	6.980	5,4	3,9	13.461	erhöht	positiv	positiv	4,7	positiv	positiv	4,1
6	NB positiv	936	7,7	1,0	1.978	erhöht	positiv	positiv	5,0	positiv	positiv	1,4
7	NB positiv	868	7,6	2,0	1.468	erhöht	positiv	positiv	10,3	positiv	positiv	2,0
8	NB positiv	58.750	42,2	79,4	373.343	> ULOQ	positiv	positiv	7,1	positiv	positiv	2,1
9	NB positiv	14.200	58,0	12,7	36.112	> ULOQ	positiv	positiv	2,6	positiv	negativ	nb
10	NB positiv	5.590	217	11	10.015	erhöht	positiv	negativ	20,4	positiv	positiv	6,0
11	NB negativ	18			77,5	erhöht	negativ	negativ		negativ	negativ	
12	NB negativ	90			228	erhöht	negativ	negativ		negativ	negativ	
13	NB negativ	< 4			39,0	normal	negativ	negativ		negativ	negativ	
14	NB negativ	< 4			42,5	normal	negativ	negativ		negativ	negativ	
15	NB negativ	240			477	erhöht	negativ	negativ		negativ	negativ	
16	NB negativ	-			136	erhöht	negativ	negativ		negativ	negativ	
17	NB negativ	-			54,4	normal	negativ	negativ		negativ	negativ	
18	NB negativ	< 4	0,7	kA	64,4	normal	positiv	negativ	1,2	positiv	negativ	nb
19	NB negativ	-			48,8	normal	negativ	negativ		negativ	negativ	

### Serum-Paare aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch

Neben den Proben aus der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm wurden auch CSF/Serum-Paare aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch analysiert. Von drei Patienten lagen so genannte Verlaufsproben vor. Die erste Punktion fand vor einer Behandlung mit Antibiotika (AB) statt. Die zweite Punktion folgte einige Tage nach Beginn der AB-Therapie. Die Ergebnisse zu den entsprechenden Proben sind in der Tabelle 4-23 zu finden. Während bei der IgG/IgM-Klassifizierung kein Unterschied zwischen den verschiedenen Punktionszeitpunkten festgestellt werden konnte, zeigte sich bei Betrachtung des CXCL13 dagegen eine Abnahme der Konzentration nach Beginn der AB-Therapie. Eine graphische Darstellung der ermittelten CXCL13-Konzentrationen zusammen mit der CXCL13-Standardkurve (Abbildung 4-32) verdeutlicht die Abnahme der Konzentration. Bei dem ersten Patienten mit einer AB-Behandlung von 13 Tagen konnte eine deutlich stärkere Abnahme beobachtet werden als bei den Patienten mit einer Behandlung von 6 bzw. 7 Tagen.



**Abbildung 4-32: CXCL13-Konzentration bei CSF-Verlaufsproben.**

Von drei Patienten aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch wurden mit dem *Borrelia neuroplex* CSF/Serum-Paare vor und nach einer Antibiotika-Behandlung analysiert. Dargestellt sind die CXCL13-Standardkurve sowie die CXCL13-Konzentrationen der CSF-Verlaufsproben. Die Standardkurve wurde in Duplikaten gemessen. Es sind die MFI-Mittelwerte mit der dazugehörigen SD eingezeichnet. Die Messung der CSF-Proben erfolgte in Einfachbestimmungen. Als gestrichelte Linien sind der LLOQ sowie der festgelegte CXCL13-Grenzwert eingetragen.

**Tabelle 4-23: Messung von CSF/Serum-Paaren aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch.**

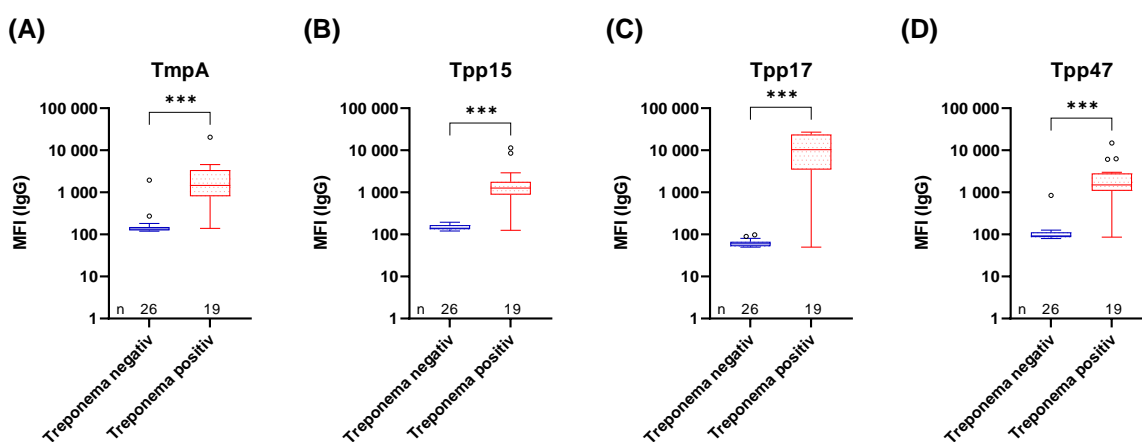
Von drei Patienten aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch wurden mit dem Borrelia neuroplex CSF/Serum-Paare vor und nach einer Antibiotika-Behandlung analysiert. Neben der IgG/IgM-Klassifizierung wurde der Borrelien-spezifische Liquor/Serum-Antikörperindex berechnet und die CXCL13-Konzentration in den CSF-Proben bestimmt.

AB = Antibiotika, VF = Verdünnungsfaktor

Patient	Zeitpunkt der AB-Behandlung	CXCL13 (pg/mL) - ohne VF			IgG-Klassifizierung			IgM-Klassifizierung		
		CSF	Serum	AI	CSF	Serum	AI	CSF	Serum	AI
1	vor Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	4,3	positiv	negativ	3,2
	13 Tage nach Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	2,2	positiv	negativ	6,2
2	vor Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	4,4	positiv	positiv	2,0
	7 Tage nach Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	5,8	positiv	positiv	1,7
3	vor Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	5,5	positiv	positiv	10,5
	6 Tage nach Beginn der AB-Behandlung		erhöht	positiv	positiv	positiv	7,8	positiv	positiv	15,8

### 4.3.6 Integration von *Treponema*-Antigenen

Um eine Neurosyphilis, bei welcher ebenfalls erhöhte CXCL13-Konzentrationen im CSF vorliegen, ausschließen zu können, wurden in den *Borrelia neuroplex* zusätzlich Antigene des Erregers *Treponema pallidum ssp. pallidum* integriert. Eine erste Messung von 19 *Treponema*-positiven Serum-Proben (Central BioHub) ergab im Vergleich zu 26 *Treponema*-negativen Serum-Proben (Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm und Sächsisches Krankenhaus Rodewisch) bei der IgG-Detektion einen deutlichen Unterschied in den MFI-Signalen (Abbildung 4-33). Bei der IgM-Detektion konnten keine Unterschiede zwischen den positiven und negativen Proben festgestellt werden.



**Abbildung 4-33: Box-Whisker-Plots der IgG-Signale bei *Treponema*-negativen und -positiven Proben.**

Mit den Box-Whisker-Plots wurde die Verteilung der MFI-Signale der IgG-Detektion bei 19 *Treponema*-positiven Proben (Central BioHub) und 26 *Treponema*-negativen Proben (Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm + Sächsisches Krankenhaus Rodewisch) untersucht. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Sofern vorhanden, sind die festgesetzten Grenzwerte (cut offs) durch eine gestrichelte Linie eingezeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

## 5 Diskussion

### 5.1 Bedeutung der Serologie in der Borreliose-Diagnostik

Die Serologie wird in der Diagnostik zur Unterstützung bei einem zur Lyme-Borreliose passenden klinischen Bild eingesetzt<sup>2,6,48</sup>. Der Nachweis einer Infektion erfolgt in der Regel indirekt über die Detektion Borrelien-spezifischer Antikörper<sup>100</sup>. Empfohlen wird momentan eine 2-Stufendiagnostik bestehend aus einem Immunoassay und einem Immunoblot<sup>3,15,20</sup>. Vor allem bei einer frühen lokalisierten Infektion mit einer weniger ausgeprägten Immunreaktion fehlt es bei dieser Vorgehensweise jedoch oft an Sensitivität, so dass es immer wieder zu falsch-negativen Ergebnissen kommt bzw. Antikörper nur bei 20-50 % der Erkrankten nachgewiesen werden können<sup>48</sup>. Mit dem *Borrelia* multiplex ist es gelungen einen sensitiveren Borreliose-Test zu entwickeln, welcher durch die verwendete xMAP-Technologie dem herkömmlichen ELISA überlegen ist. Unabhängig von der Sensitivität des verwendeten Assays, muss jedoch beachtet werden, dass der Nachweis spezifischer Antikörper keine Aussage über die Aktualität einer Infektion liefert. Antikörper können auch nach einer erfolgreichen Behandlung noch Monate bis Jahren im Körper vorhanden sein<sup>15,48</sup>. So konnten in einer Studie von Kalish et al. (2001)<sup>101</sup> noch 10-20 Jahre nach einer Infektion IgG- und IgM-Antikörper im Serum von Patienten nachgewiesen werden, wobei die IgG-Antikörper dominierten und die Höhe des Titers vom Infektionsstadium abhängig war. Wurden die Patienten frühzeitig mit Antibiotika behandelt, konnten nur bei 17 % Antikörper nachgewiesen werden. Lag dagegen eine fortgeschrittene Infektion vor, waren bei allen Patienten unabhängig von einer Behandlung Antikörper nachweisbar<sup>101</sup>. Auch in einer Studie Glatz et al. (2006)<sup>102</sup> konnte gezeigt werden, dass vor allem bei Patienten mit einer langen Krankheitsdauer oder einer starken lokalen Infektion eine anhaltende Seropositivität vorliegt<sup>102</sup>. Aus diesem Grund ist die Serologie auch nicht für die Kontrolle des Therapieverlaufs geeignet<sup>51,101-103</sup>. Bei einer frühzeitig begonnenen Therapie kann es zudem zu einem Ausbleiben der Serokonversion kommen<sup>102,104</sup>. Konstant hohe Antikörper-Titer dagegen sind kein Zeichen für ein Therapieversagen<sup>104</sup>.

Ist die Serologie bei einem Patienten mit Borreliose-typischen Symptomen nach mehr als sechs Wochen negativ, kann im Allgemeinen nicht von einer Borrelien-Infektion ausgegangen werden<sup>15,20,49</sup>. Liegt tatsächlich eine Borrelien-Infektion vor, so kommt es zunächst zu einer Bildung spezifischer IgM-Antikörper<sup>105</sup>. Der höchste IgM-Titer wird 3-6 Wochen nach einer Infektion erwartet<sup>3</sup>. Spätestens nach 4 Wochen sollten dann bei einer unbehandelten Infektion auch spezifische IgG-Antikörper nachweisbar sein<sup>15</sup>. Patienten mit einer schon länger zurückliegenden bzw. fortgeschrittenen Infektion sollten in jedem Fall IgG-Antikörper gebildet

haben<sup>49</sup>. Eine IgM-Positivität bei gleichzeitiger IgG-Negativität ist somit kein Zeichen für eine fortgeschrittene Infektion<sup>49</sup>.

## 5.2 Antigen-Auswahl für den *Borrelia multiplex* / *neuroplex*

Bei der Entwicklung eines erfolgreichen serologischen Assays spielt vor allem die Antigenauswahl eine große Rolle. In Europa ist hierbei die Heterogenität zwischen den verschiedenen Arten zu beachten. Aus diesem Grund müssen die ausgewählten Antigene zwei Anforderungen erfüllen. Zum einen ist eine Abdeckung der antigenen Diversität notwendig, zum anderen dürfen keine Kreuzreaktionen zu anderen Erregern auftreten<sup>48,100</sup>. Im *Borrelia multiplex* / *neuroplex* wurden daher sechs Antigene zum Nachweis einer IgG-Antwort und zwei Antigene zum Nachweis einer IgM-Antwort eingesetzt.

Das wichtigste IgG-dominante Antigen ist das VlsE. Es ist stark immunogen und löst bereits in der frühen Phase einer Infektion eine Immunantwort aus<sup>6,48,100</sup>. Eine Analyse der Aminosäuresequenz bei den verschiedenen humanpathogenen Arten wies auf eine starke Heterogenität (durchschnittliche Sequenzübereinstimmung: 40,9 %) des Antigens hin. Es ist jedoch bekannt, dass das Antigen eine stark konservierte immunogene Region (IR6)<sup>51,96</sup> besitzt, welche als Peptid bereits in zahlreichen Immunoassays verwendet wird<sup>106-108</sup>. Auch in dieser Arbeit wurde ein Peptid mit der entsprechenden Sequenz getestet. Sowohl bei dem Peptid als auch bei dem eingesetzten Vollängen-Antigen (VlsE - B31) konnte bei fast allen Proben eine starke IgG-Antwort detektiert werden. Final wurde auf den Einsatz des Peptids verzichtet, da es gegenüber dem Vollängen-Antigen keinen Vorteil hatte. Zudem besitzt VlsE noch weitere immunogene Regionen<sup>96,109</sup>, welche durch ein Peptid nicht berücksichtigt worden wären. Bei diesen Regionen handelt es sich um Sequenzen in den N- und C-terminalen invariablen Domänen des Antigens<sup>96,109</sup>, welche keiner Genkonversion unterliegen und somit nicht in verschiedenen Variationen vorkommen<sup>110</sup>. Eine Immunreaktion gegen diese Regionen tritt erst im späten Stadium einer Infektion auf<sup>96,109</sup>. Dies liegt vermutlich daran, dass die Regionen auf Grund ihrer Nähe zur Membranoberfläche nur schwer zugänglich sind und somit Antikörper erst bei einer verstärkten Antigen-Verarbeitung durch Immunzellen bzw. einer erweiterten Immunantwort gegen verschiedene Epitope gebildet werden<sup>96</sup>. Antikörper gegen die IR6-Region dagegen werden bereits früher gebildet und können über den gesamten Krankheitsverlauf nachgewiesen werden<sup>96</sup>. Die IR6-Region befindet sich in der variablen Domäne des VlsE<sup>96,109</sup> und liegt im Inneren der Membran-fernen Region. Auch sie unterliegt keiner Genkonversion<sup>111</sup>. Weitere IgG-dominante Antigene im *Borrelia multiplex* / *neuroplex* sind die Antigene BmpA, p83/100 und OppA-2. Alle werden jeweils nur von einer Art eingesetzt. Bei dem Antigen OppA-2 von der Art *B. bavariensis* (PBi) konnte eine nahezu genauso starke Immunantwort wie bei dem Antigen VlsE detektiert werden. In der Literatur

wird eine geringere Reaktivität gegenüber diesem Antigen beobachtet<sup>112</sup>. Bei den Antigenen BmpA und p83/100, beide von der Art *B. afzelii* (PKo), lag eine deutlich geringere Reaktivität vor. In frühen Studien wird BmpA auch als IgM-dominantes Antigen beschrieben<sup>113,114</sup>. Im *Borrelia multiplex* / *neuroplex* konnte jedoch keine IgM-Reaktivität gegenüber diesem Antigen festgestellt werden und auch bei anderen Studien konnten keine IgM-Antikörper gegen das BmpA-Antigen nachgewiesen werden<sup>112,115</sup>. Der Einsatz als IgM-dominantes Antigen ist daher umstritten. Das letzte IgG-dominante Antigen ist das DbpA. Antikörper gegen dieses Antigen können vor allem bei Patienten mit einer fortgeschrittenen Lyme-Borreliose nachgewiesen werden<sup>116</sup>. Auf Grund der starken Heterogenität des Antigens (durchschnittliche Sequenzübereinstimmung: 45,2 %) und einer fehlenden immundominanten konservierten Region wurden das Antigen im *Borrelia multiplex* / *neuroplex* von allen fünf humanpathogenen Arten in Europa eingesetzt. Es zeigte sich jedoch trotz der hohen Sequenzheterogenität und der fehlenden immundominanten Region eine Kreuzreaktivität zwischen den Antigenen der einzelnen Arten. So lag bei vielen Proben eine Reaktion gegen mehrere DbpA-Antigene vor, weshalb eine Verwendung von zwei Antigenen für die Probenklassifizierung ausreichend war. Es wurden die Antigene der Arten *B. garinii* (20047) und *B. afzelii* (PKo) gewählt, da bei diesen in den ROC-Analysen die höchsten AUC-Werte berechnet wurden. Zudem handelt es sich bei den Arten um die dominanten Arten in Europa. Vor allem gegenüber dem Antigen der Art *B. afzelii* konnte eine hohe IgG-Reaktivität festgestellt werden. Zudem waren Antikörper meist nur bei einer der beiden Arten detektierbar. Dies konnte auch bei Heikkilä et al. (2002)<sup>116</sup> bei einer Studie zur Art-spezifischen Serodiagnostik mittels DbpA festgestellt werden<sup>116</sup>.

Für die IgM-Detektion wurde ausschließlich das Antigen OspC verwendet, da nur hier eine ausreichend sensitive Unterscheidung zwischen den MFI-Signalen von negativen und positiven Proben möglich war. Bei OspC handelt es sich um einen Virulenzfaktor für die Dissemination im Körper<sup>7,17,33</sup>. Es wird von den Borrelien in der frühen Phase einer Infektion exprimiert und löst daher eine starke IgM-Antwort aus<sup>48,100,117</sup>. Die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung liegt bei diesem Antigen bei 73,9 % und ist damit etwas höher als bei den Antigenen VlsE und DbpA. Wie auch bei dem Antigen VlsE ist hier eine immundominante konservierte Region bekannt<sup>51,117</sup>. Diese befindet sich im C-Terminus des Antigens, welcher nahe an der Membranoberfläche liegt.<sup>118,119</sup> Die anderen Regionen des OspC sind dagegen hoch variabel und unterscheiden sich bei den verschiedenen Arten in ihrer Aminosäuresequenz<sup>119</sup>. Auch hier wurde ein Peptid mit der entsprechenden Sequenz der immundominanten Region getestet. Es wurde jedoch final nicht im *Borrelia multiplex* / *neuroplex* eingesetzt, da im Vergleich zu den Vollängen-Antigenen höhere MFI-Signale bei den negativen Proben gemessen wurden. Zudem lag bei den meisten Proben der Assay-Entwicklung eine IgM-Reaktivität bei mindestens drei von fünf *Borrelia*-Arten vor,

so dass das OspC letztendlich nur von zwei Arten eingesetzt wurde. Es wurden die Antigene von *B. garinii* (20047) und *B. afzelii* (PKo) verwendet, da diese zum einen bei den Proteinanalysen mit dem Prometheus NT.48 eine hohe Proteinstabilität aufwiesen und zum anderen bei der Untersuchung zur Reproduzierbarkeit der Kopplung hohe Korrelationskoeffizienten ( $r = 0,909$  (*B. garinii*) bzw.  $r = 0,973$  (*B. spielmanii*)) berechnet wurden. Lediglich bei dem Antigen der Art *B. bavariensis* (PBi) konnte ein höherer Korrelationskoeffizient ( $r = 0,984$ ) berechnet werden. Bei diesem Antigen wurde jedoch auf Grund der Proteinanalysen mit dem Prometheus NT.48 eine schlechte Proteinstabilität vermutet. Bei der Bewertung dieser Analysen ist allerdings zu beachten, dass diese auf der intrinsischen Fluoreszenz der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin beruhen. Diese emittieren nach Anregung bei 285 nm auf Grund ihres  $\pi$ -Elektronensystems Fluoreszenz im UV-Bereich, wobei vor allem die Indolgruppe des Tryptophans eine starke Fluoreszenz besitzt<sup>120,121</sup>. Die intrinsische Fluoreszenz der ebenfalls aromatischen Aminosäure Phenylalanin ist auf Grund des geringen Absorptionsvermögens der Aminosäure vernachlässigbar<sup>121</sup>. Besitzt ein Antigen (wie z.B. OspC) kein bzw. wenig Tryptophan oder Tyrosin ist eine Stabilitätsmessung mit dem Prometheus NT.48 demnach schwierig und nur bei höheren Konzentration ( $> 1,0$  mg/mL) möglich. Die Ergebnisse aus den Proteinanalysen sollten daher in jedem Fall mit Vorsicht betrachtet werden. Bei der IgG-Detektion spielt OspC keine Rolle, da Borrelien dessen Expression bereits kurz nach der Infektion herunter regulieren, um so einer zu starken Immunantwort des Körpers zu entgehen<sup>19,33</sup>. Das ebenfalls IgM-dominante Antigen p41 bzw. dessen internes Fragment p41i wurden nicht im Borrelia multiplex / neuroplex verwendet, da sich die Expression und Aufreinigung dieses Antigens als schwierig erwies und insgesamt im Borrelia multiplex / neuroplex nur sehr niedrige MFI-Signale gemessen wurden. Generell handelt es sich bei p41 um ein sehr unspezifisches Antigen, bei welchem eine Kreuzreaktion zu anderen Pathogenen nicht ausgeschlossen werden kann<sup>34,122</sup>. Es wird daher nur der Einsatz eines internen Fragments, welches spezifisch für eine Borrelien-Infektion ist, empfohlen<sup>34,122</sup>. Um die IgM-Sensitivität zu verbessern könnte der Einsatz eines Fragments mit einer anderen Aminosäuresequenz getestet werden. Dabei muss jedoch immer das Risiko einer Kreuzreaktivität bedacht werden.

Generell kann eine korrekte Probenklassifizierung nur über die Kombination der verschiedenen Antigene erfolgen. Die Auswahl der Antigene ist dabei entscheidend und stellt nach wie vor ein Problem in der Borreliose-Diagnostik dar<sup>20</sup>. Bei dem Borrelia multiplex / neuroplex erfolgte die Klassifizierung über sechs IgG-dominante und zwei IgM-dominante Antigene. Der Klassifizierungsalgorithmus wurde so gewählt, dass eine Probe nur dann als IgG-positiv galt, wenn mindestens eine Reaktion gegen das VlsE-Antigen und ein weiteres IgG-dominantes Antigen oder bei fehlender VlsE-Reaktion gegen drei IgG-dominante



Antigene vorlag. Eine Reaktion gegen das VlsE alleine wurde als nicht ausreichend empfunden. Bei der IgM-Klassifizierung dagegen reichte eine Reaktion bei einem der beiden OspC-Antigene aus. Hier wurden bewusst nur die beiden IgM-dominanten OspC-Antigene betrachtet, da bei den meisten anderen Antigenen eine Unterscheidung zwischen IgM-positiven und IgM-negativen Proben anhand der MFI-Signale kaum möglich war und somit eine Integration dieser Antigene zu falsch-positiven Ergebnissen geführt hätte.

### **5.3 Anwendbarkeit des *Borrelia multiplex***

#### **5.3.1 Stabilität des *Borrelia multiplex***

Mit dem *Borrelia multiplex* ist es gelungen einen stabilen Assay, welcher reproduzierbare Ergebnisse liefert, zu entwickeln. Das einfache Grundprinzip macht es möglich den Assay nach dessen Entwicklung schnell zu modifizieren und an verschiedene Anforderungen anzupassen. Zudem eignet sich der *Borrelia multiplex* durch seine Automatisierung hervorragend für Messungen im Hochdurchsatz und ermöglicht somit die schnelle und effiziente Analyse von großen Probensets. Für die Messung von kleineren Probensets kann auf eine manuelle Durchführung des *Borrelia multiplex* zurückgegriffen werden.

Bei der Probenklassifizierung konnten zum Teil Unterschiede zwischen der manuellen und der automatisierten Durchführung festgestellt werden. Diese sind vermutlich auf ein genaueres Arbeiten bei der manuellen Durchführung zurückzuführen. So können bei einer manuellen Durchführung besondere Probeneigenschaften, wie z.B. eine Lipämie, besser berücksichtigt werden. Bei einer automatisierten Durchführung im Hochdurchsatz ist dies nicht möglich. Insgesamt lag bei weniger als 5 % der Proben eine abweichende finale Klassifizierung vor, was bei der Messung eines großen Probensets akzeptabel ist. Hier überwiegen auch bei einer etwas geringeren Sensitivität nach wie vor die Vorteile einer automatisierten Durchführung.

Eine Besonderheit des Assays ist die gleichzeitige Detektion von IgG- und IgM-Antikörpern auf der INTELLIFLEX Plattform. Dafür ist die Verwendung von zwei unterschiedlichen Detektionssystemen notwendig. Für die IgM-Detektion wurde ein PE-konjugierter Detektionsantikörper verwendet. PE zählt zu den stärksten momentan verwendeten Fluorophoren<sup>92</sup> und wird bereits seit vielen Jahren in Immunoassays als Fluoreszenzmarker eingesetzt<sup>91</sup>. Mit einem Absorptionsmaximum bei 565 nm und einem Emissionsmaximum bei 580 nm<sup>91</sup> ist es für den ersten Reporter Channel der INTELLIFLEX<sup>73</sup> geeignet. Für die IgG-Detektion wurde ein biotinylierter Detektionsantikörper zusammen mit einem BV421-konjugiertem Streptavidin verwendet. BV421 ist ebenfalls ein starkes Fluorophor, welches eine ähnliche Fluoreszenzintensität wie das PE besitzt<sup>92</sup> und mit einem Absorptionsmaximum bei 407 nm bzw. einem Emissionsmaximum bei 421 nm<sup>92</sup> für den

zweiten Reporter Channel der INTELLIFLEX<sup>73</sup> geeignet ist. Es wurde für die IgG-Detektion verwendet, da IgM-Antikörper als bindungsschwächer gelten<sup>39,42,123,124</sup> und somit die Verwendung des stärkeren Fluorophors für die IgM-Detektion sinnvoll erschien. Eine Kreuzreaktion zwischen den beiden Detektionssystemen konnte während der Übertragung des *Borrelia multiplex* von der FLEXMAP 3D Plattform auf die INTELLIFLEX Plattform ausgeschlossen werden. Sowohl bei der IgG-Detektion als auch der IgM-Detektion korrelierten die MFI-Signale bei einer getrennten Antikörper-Detektion mit den MFI-Signalen bei einer gemeinsamen Detektion. Eine generelle Verdrängung von IgM-Antikörpern durch IgG-Antikörper konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Hätte eine Verdrängung vorgelegen, hätte man die Proben vor der IgM-Detektion mit einem RF-Absorbens behandeln müssen. Ein gleichzeitiger IgG/IgM-Nachweis wäre dann nicht möglich gewesen, was einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Mehraufwand bedeutet hätte. Eine Interferenz durch die Rheumafaktoren selbst konnte bei der IgM-Detektion ebenfalls nicht beobachtet werden. Rheumafaktoren sind bei bis zu 5 % der gesunden Bevölkerung nachweisbar, mit zunehmendem Alter sogar häufiger<sup>125,126</sup>. Die Wahrscheinlichkeit einer RF-Interferenz bei großen Probensets wurde daher als gering eingeschätzt, so dass auch hier der Vorteil der gleichzeitigen IgG/IgM-Detektion überwog.

### 5.3.2 Assay-Präzision des *Borrelia multiplex*

Für eine Aussage über die Assay-Präzision wurde der *Borrelia multiplex* mit einem kommerziellen Bead-basierten Borreliose-Test sowie einer für die Diagnose empfohlenen 2-Stufen-Diagnostik bestehend aus einem ELISA und einem Immunoblot verglichen.

Im Vergleich mit der 2-Stufen-Diagnostik lag mit einem Cohen's Kappa Koeffizienten von 0,862 (95%CI 0,781 - 0,942) eine hohe Übereinstimmung in der IgG-Klassifizierung vor. Bei der IgM-Klassifizierung dagegen war die Übereinstimmung mit einem Cohen's Kappa Koeffizienten von 0,185 (95%CI 0,041 - 0,330) deutlich geringer. So wurden mit dem *Borrelia multiplex* 38 Proben der MuSPAD-Studie als IgM-positiv klassifiziert, welche bei der 2-Stufen-Diagnostik bereits im ELISA negativ waren. Dies lässt eine höhere Sensitivität des *Borrelia multiplex* für die Früherkennung einer Lyme-Borreliose vermuten. Die im Vergleich berechnete IgM-Sensitivität von 71,4 % (95%CI 35,9 - 94,9 %) ist damit vermutlich nicht ganz korrekt. Hier ist vor allem zu bedenken, dass insgesamt nur eine relativ geringe Anzahl an IgM positiven Proben ( $n = 7$ ) vorlag, was eine präzisere Bestimmung der Sensitivität nicht möglich machte. Aus diesem Grund sollte auch die im Vergleich zum recomBead *Borrelia* IgM 2.0 berechnete Sensitivität von 54,5 % (28,0 - 78,7 %) mit Vorsicht betrachtet werden.

Bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 handelt es sich um einen Bead-basierten Assay, mit einem ähnlichen Antigen-Panel wie bei dem *Borrelia multiplex*. Durch die ebenfalls verwendete

xMAP-Technologie wurde der Test als eine Art Goldstandard bei der Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des *Borrelia multiplex* verwendet und es wurde eine hohe Übereinstimmung in der Probenklassifizierung zwischen den beiden Tests erwartet. Mit einem Cohen's Kappa Koeffizienten von 0,938 (95%CI 0,888 - 0,987) bei der IgG-Klassifizierung wurden diese Erwartungen erfüllt. Bei der IgM-Klassifizierung dagegen war die Übereinstimmung mit einem Cohen's Kappa Koeffizienten von 0,504 (95%CI 0,249 - 0,758) deutlich geringer. Unterschiede in beiden Klassifizierung sind vermutlich auf verschiedene Klassifizierungsalgorithmen zurückzuführen. Generell wurde der Klassifizierungsalgorithmus für den *Borrelia multiplex* in Anlehnung an den Algorithmus des recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 entwickelt. So basieren beide Algorithmen auf der Bewertung des Antigensignals im Verhältnis zum Signal eines definierten cut offs (*Borrelia multiplex*: S/CO, recomBead *Borrelia*: COI). Zudem wird in beiden Fällen ein Grenzwertbereich definiert, welcher mit einem Punkt bewertet wird. Dieser ist jedoch bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 ( $0,67 \leq \text{COI} < 1,00$ ) größer als bei dem *Borrelia multiplex* ( $0,75 \leq \text{S/CO} < 1,00$ ). Ab einem S/CO bzw. COI  $\geq 1,00$  gilt die Antikörperantwort gegen ein Antigen als positiv. Die Bewertung einer positiven Antikörperantwort ist bei beiden Tests in etwa gleich. Der einzige Unterschied besteht in der Bewertung der OspC-Antigene. Bei dem *Borrelia multiplex* werden die OspC-Antigene getrennt betrachtet und es werden jeweils drei Punkte vergeben. Bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 dagegen werden die Antigene zusammen betrachtet und es werden vier Punkte vergeben. Auch unterscheiden sich die Tests hier in der Auswahl der *Borrelia*-Arten. Während im *Borrelia multiplex* die OspC-Antigene der Arten *B. garinii* und *B. spielmanii* verwendet werden, kommen im recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 die Antigene der Arten *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* vor. Damit wurden bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 die in Europa am häufigsten vorkommenden Arten gewählt. Bei dem *Borrelia multiplex* erfolgte die Auswahl auf Grund der Stabilität der Antigene. Auch bei dem DbpA-Antigen wurde die Sequenzheterogenität bei beiden Tests berücksichtigt und das Antigen von allen fünf humanpathogenen Arten in Europa eingesetzt. Bei dem *Borrelia multiplex* werden jedoch nur die Arten *B. garinii* und *B. afzelii* für die Probenklassifizierung benötigt. Wie auch bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 werden die Antigene zusammen bewertet. Die finale Klassifizierung der Proben erfolgt bei beiden Tests über die Summe der Punkte. Mit dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 werden Proben ab einer Summe  $> 3$  als IgG- bzw. IgM-positiv klassifiziert. Bei dem *Borrelia multiplex* ist für eine positive IgG-Klassifizierung eine Summe  $\geq 5$  nötig. Hier muss auch beachtet werden, dass bei dem recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0 nicht zwischen IgG- und IgM-dominanten Antigenen unterschieden wird und bei jeder Klassifizierung alle Antigene berücksichtigt werden. Dies hat vor allem Auswirkungen auf die IgM-Klassifizierung und erklärt die dort größeren Unterschiede in der Probenklassifizierung. So werden bei dem recomBead *Borrelia* IgM 2.0 Proben auch

dann als IgM-positiv klassifiziert, wenn eine Reaktion nur gegen IgG-dominante Antigene, nicht aber gegen eines der IgM-dominanten OspC-Antigene, vorliegt. Bei dem *Borrelia multiplex* dagegen gilt eine Probe dagegen nur dann als IgM-positiv, wenn eine Reaktion gegen ein OspC-Antigen vorliegt. Infolgedessen wurden bei der Probenmessung zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des *Borrelia multiplex* weniger Proben als IgM-positiv klassifiziert, wodurch der *Borrelia multiplex* weniger sensitiv erscheint als er vielleicht tatsächlich ist. So kann auch eine fehlerhafte IgM-Klassifizierung mit dem recomBead *Borrelia* IgM 2.0 auf Grund der oben beschriebenen Vorgehensweise bei der Probenklassifizierung nicht ausgeschlossen werden.

Bei der Betrachtung der für den *Borrelia multiplex* berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten ist generell zu beachten, dass diese auf Grundlage eines Vergleichs mit einem anderen Test berechnet wurden, welcher selbst bereits eine gewisse Ungenauigkeit aufweist. Die Bewertung der Genauigkeit des *Borrelia multiplex* sollte daher eher als Einschätzung gesehen werden. Um den Assay weiter zu optimieren und die tatsächliche Sensitivität und Spezifität zu bestimmen, ist ein gut charakterisiertes Probenstet mit Angaben zur Labordiagnostik und dem klinischen Bild erforderlich. Ein solches würde auch einen besseren Vergleich mit den kommerziell erhältlichen Tests ermöglichen. Diese sind oft ebenfalls nicht anhand eines gut charakterisierten Probenstets standardisiert, so dass die diagnostische Übereinstimmung zwischen manchen Tests vor allem bei der IgM-Detektion gering ist<sup>78,127</sup>.

### 5.3.3 Seropositivität gegenüber *Borrelia burgdorferi* senu lato in Deutschland

Die Epidemiologie befasst sich mit der Häufigkeit und der Verbreitung von Krankheiten in der Bevölkerung<sup>128,129</sup>. Bei der Infektionsepidemiologie geht es vor allem um die Ursache, die Folge und die Prävention übertragbarer Erkrankungen<sup>128</sup>. Auch bei der Lyme-Borreliose ist die Etablierung epidemiologischer Studien entscheiden für das Verständnis der Pathogenese und Voraussetzung für die Ergreifung von Maßnahmen zur Krankheitsbekämpfung<sup>11</sup>.

In Deutschland wird eine genaue Aussage über die Verbreitung der Lyme-Borreliose unter anderem durch eine fehlende Meldepflicht in 7 von 16 Bundesländern erschwert<sup>12</sup>. Große Longitudinalstudien bzw. Follow-up-Studien sind daher unabdingbar, um einen genauen Überblick über die Serokonversion in der Bevölkerung zu bekommen. So wurden solche Studien zum Beispiel bereits mehrfach bei der Covid-19 Pandemie erhoben, um einen Überblick über den Verlauf der Antikörperantwort bei einer SARS-CoV-2 Infektion<sup>130,131</sup> zu bekommen oder den Impferfolg bei verschiedenen Patientengruppen<sup>132</sup> zu untersuchen.

Durch seine Automatisierung und die damit verbundene Möglichkeit Proben im Hochdurchsatz zu messen, ist auch der *Borrelia multiplex* für solche Studien bestens geeignet. Um dies zu zeigen, wurden Proben einer Querschnittskohorte aus der MuSPAD-Studie analysiert. Die

Kohorte bestand aus 708 Männer und 847 Frauen im Alter von 18-90 Jahren und umfasste sieben Standorte in Deutschland. Es konnte festgestellt werden, dass die Seropositivität bei den männlichen Studienteilnehmern (15,0 %, 95 %CI 12,5 - 17,8 %) doppelt so hoch war wie bei den weiblichen Teilnehmern (8,5 %, 95 %CI 6,8 - 10,6 %). Dies konnte auch bei anderen serologischen Studien zur Untersuchung der Seroprävalenz in Deutschland<sup>133,134</sup> und Skandinavien<sup>135</sup> beobachtet werden. Studien basierend auf Meldedaten und Krankenkassenabrechnungen dagegen berichten von einer höheren Inzidenz bei Frauen als bei Männern<sup>12,136</sup>. Ein Grund hierfür könnte ein unterschiedliches Verhalten von Männern und Frauen bei der Gesundheitsvorsorge sein. So suchen Männer bei milden Symptomen vermutlich weniger häufig einen Arzt auf und ihre Erkrankung wird somit nicht von den Meldesystemen erfasst<sup>12,136</sup>. Zudem muss bei den verschiedenen Studien zwischen den Begriffen „Prävalenz“ und „Inzidenz“ unterschieden werden. Während die Prävalenz (auch als Seroprävalenz bezeichnet) Aufschluss über alle bestehenden Fälle gibt, werden bei der Berechnung der Inzidenz nur neu auftretende Fälle berücksichtigt<sup>137</sup>. Beide Begriffe stehen oft in direkter Verbindung mit einer Erkrankung. Liegen, wie bei der Querschnittskohorte aus der MuSPAD-Studie, keine Daten zu einer Borreliose-Erkrankung vor, sind die Begriffe nicht passend und es kann korrekterweise nur von einer „Seropositivität“ gesprochen werden. Bei Betrachtung der Seropositivität an den einzelnen Standorten konnte lediglich am Standort Greifswald (Mecklenburg-Vorpommern) eine etwas höhere Seropositivität (16,6 %, 95%CI 11,8 - 22,8 %) im Vergleich zu anderen Standorten, wie z.B. Reutlingen (9,6 %, 95%CI 6,9 - 13,2 %), festgestellt werden. Generell ist ein Vergleich der Standorte jedoch schwierig, da dabei unter anderem die regionalen Unterschiede im Infektionsrisiko berücksichtigt werden müssen<sup>12,138</sup>. Auch ein Vergleich mit den Seropositivitäten aus anderen Studien ist schwierig, da die berechneten Sensitivitäten stark von dem im Test verwendeten Klassifizierungsalgorithmus abhängig sein können<sup>139</sup>. Bei der Betrachtung der Seropositivitäten zweier früherer deutscher Kohorten<sup>134</sup>, konnten jedoch sich überschneidende Konfidenzintervalle festgestellt werden. In Bezug auf das Alter der Studienteilnehmer konnte ein Anstieg der Seropositivität mit zunehmendem Alter beobachtet werden, wie er auch in früheren Studien bei Erwachsenen festgestellt wurde<sup>133,134</sup>.

Allgemein wird das Vorkommen der Lyme-Borreliose durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So spielen unter anderem ökologische und klimatische Bedingungen, die das Habitat des Vektors beeinflussen, eine Rolle. Aber auch das Verhalten des Menschen und seine Lebensumstände sind von Bedeutung<sup>11,140</sup>. Je mehr Zeit ein Mensch in der Natur verbringt, umso größer ist die Gefahr eines Zeckenbisses und einer Borrelien-Infektion<sup>140</sup>. Waldarbeiter und Förster<sup>141</sup>, aber auch zeltende Touristen und Wanderer tragen daher ein

erhöhtes Risiko für eine Erkrankung<sup>3,142</sup>. Auch bei Kindern konnte bereits ein erhöhtes Risiko festgestellt werden, wenn diese einen Waldkindergarten besuchten<sup>143</sup>.

## **5.4 Anwendbarkeit des *Borrelia neuroplex***

### **5.4.1 IgG/IgM-Detektion im CSF**

CSF ist in seiner Zusammensetzung fein reguliert und entscheidend für die Gesundheit des Gehirns. Alters- oder krankheitsbedingte Veränderungen können zu einem Abbau der neuronalen Leistungsfähigkeit führen<sup>144</sup>. Aus diesem Grund ist eine frühzeitige Diagnose von Infektionen des zentralen Nervensystems entscheidend für eine erfolgreiche und vor allem rechtzeitige Therapie.

Bei einer Neuroborreliose erfolgt die Diagnose unter anderem über den Nachweis intrathekalen Antikörper, welche bei unbehandelten Patienten etwa zwei Wochen nach einer Infektion im CSF nachweisbar sein sollten<sup>52</sup>. Zudem ist auch der Nachweis entzündlicher Liquorveränderungen für eine gesicherte Diagnose notwendig<sup>52</sup>. Eine solche Liquorveränderung stellt die Pleozytose dar, bei der es zu einer erhöhten Zellzahl im Liquor kommt. Zudem ist auch eine Blut-Liquor-Schrankenstörung typisch<sup>52</sup>. Ein anerkannter Indikator für eine Schrankenstörung ist der Albumin-CSF/Serum-Konzentrationsquotient, da im CSF vorhandenes Albumin ausschließlich aus dem Serum kommen kann<sup>145</sup>. Generell kann es entweder durch eine Schrankenstörung oder eine intrathekale Antikörpersynthese zu einem Anstieg der Proteinkonzentration im CSF kommen. Das Reiber-Diagramm gibt darüber Aufschluss<sup>145</sup>. Bei einem gesunden Menschen werden etwa 20 % aller Proteine im CSF intrathekal gebildet. Die restlichen Proteine stammen aus dem Serum<sup>145</sup>. Intrathekale Antikörper werden durch infiltrierte B-Zellen gebildet, welche sich im CSF lokal vermehren und ausreifen. Bei einer Neuroborreliose liegt häufig eine Dreiklassenreaktion (IgM>IgG>IgA) mit dominierender intrathekalen IgM-Synthese und gleichzeitiger Blut-Liquor-Schrankenstörung vor<sup>94,145</sup>. Ein Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgG, wie er bei einer Infektion im Serum zu finden ist, kommt im CSF nicht vor<sup>145</sup>.

### **5.4.2 diagnostische Wertigkeit des Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex**

Für die Berechnung des Borrelien-spezifischen Liquor/Serum-Antikörperindex (AI) wird die Methode nach Reiber empfohlen. In der aktuellen Diagnostik wird ab einem Wert > 1,5 von einem positiven AI gesprochen. Frühere Grenzwerte von 2,0 oder höher werden heute als nicht sensitiv genug angesehen<sup>95</sup>. Generell sind bei der Bewertung des AI folgende Punkte zu berücksichtigen.

1. Bei einer frühzeitigen Behandlung des Patienten kann eine humorale Immunantwort ausbleiben. In diesem Fall können keine Borrelien-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden und es wird ein negativer AI berechnet<sup>146</sup>.
2. Nach einer Behandlung sinkt die Antikörper-Konzentration im Serum oft schneller als im CSF. Dies kann kurzfristig zu einer Erhöhung des AI führen<sup>147</sup>.
3. Auch nach einer Behandlung kann ein AI bei beschwerdefreien Patienten über Monate oder sogar Jahre erhöht sein. Der AI ist daher nicht für eine Therapiekontrolle geeignet<sup>148</sup>.

Zudem kann es bei der AI-Berechnung zu erheblichen Schwankungen bei der Wiederholung eines Tests oder dem Vergleich verschiedener Tests, kommen<sup>95</sup>. So unterschieden sich zum Teil auch die berechneten AIs des *Borrelia neuroplex* deutlich von den übermittelten AIs aus der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm. Die AIs der IgG-Detektion lagen jedoch sowohl bei der Neurobiobank des Universitätsklinikums als auch bei dem *Borrelia multiplex* über dem Grenzwert von 1,5 und waren damit alle positiv. Bei der IgM-Detektion dagegen wurde bei einer Probe ein negativer AI von der Neurobiobank des Universitätsklinikums übermittelt, im *Borrelia neuroplex* wurde jedoch ein positiver AI berechnet. Umgekehrt wurde bei einer anderen Probe ein positiver AI übermittelt und mit dem *Borrelia neuroplex* ein negativer AI berechnet.

Generell sollte der Antikörperindex immer in Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik und weiteren CSF-Analysen zum Nachweis entzündlicher Liquorveränderungen bewertet werden.

### 5.4.3 CXCL13 als diagnostischer Marker der Neuroborreliose

In den letzten Jahren konnte sich neben dem Borrelien-spezifischen Antikörperindex auch das Chemokin CXCL13 als diagnostischer Marker einer Neuroborreliose etablieren<sup>52</sup>. Dabei wurde mehrfach gezeigt, dass eine erhöhte CXCL13-Konzentration bei Patienten mit einer Neuroborreliose bereits vor der intrathekalen Antikörpersynthese mit einer hohen Sensitivität<sup>55,149</sup> nachgewiesen werden kann<sup>54-56,150,151</sup>. Dies liegt unter anderem auch daran, dass es erst durch die Sekretion des Chemokins zu einer Infiltration von aktivierten B-Zellen, welche dann die intrathekalen Antikörper produzieren, kommt<sup>149</sup>. Eine erhöhte Konzentration anderer B-Zell anlockender Chemokine konnte im Zusammenhang mit einer Neuroborreliose bisher nicht gefunden werden<sup>56</sup>. So konnten Rupprecht et al. (2009)<sup>56</sup> bei Neuroborreliose-Patienten eine etwa 300-fach erhöhte Konzentration des Chemokins CXCL13 messen, stellten jedoch keine solche Erhöhung bei den Chemokinen CCL9, CCL12 und CXCL12 fest<sup>56</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass erhöhte CXCL13-Konzentrationen bei einer Neuroborreliose ausschließlich im CSF vorkommen. Im Serum konnten keinen erhöhten Konzentrationen festgestellt werden<sup>54,152</sup>. Aus diesem Grund erfolgt auch die CXCL13-Detektion mit dem

*Borrelia neuroplex* ausschließlich im CSF. Des Weiteren ist zu beachten, dass eine CXCL13-Sekretion nur bei Anwesenheit lebender Spirochäten stattfindet<sup>56,149</sup>. CXCL13 eignet sich daher als Marker einer akuten Infektion und kann somit zur Unterscheidung zwischen einer akuten und einer zurückliegenden Infektion verwendet werden<sup>55</sup>. Da die CXCL13-Konzentration nach Beginn einer Therapie rasch sinkt, ist CXCL13 zusätzlich auch für die Kontrolle des Therapieverlaufs geeignet<sup>54-56,150,151</sup>. Auch mit dem *Borrelia neuroplex* konnte eine Abnahme der CXCL13-Konzentration nach Beginn einer AB-Behandlung festgestellt werden. Damit kann der Assay bei der Therapiekontrolle eingesetzt werden.

Mittlerweile befinden sich viele verschiedene Tests für den CXCL13-Nachweis auf dem Markt. Darunter befinden sich zahlreiche ELISAs, aber auch ein Bead-basierter Assay der Firma Mikrogen. Bei allen Tests wird das CXCL13 jedoch separat von einer Antikörper-Detektion gemessen. Mit dem *Borrelia neuroplex* ist dagegen eine Quantifizierung des CXCL13 bei gleichzeitiger Detektion Borrelien-spezifischer Antikörper möglich. Dadurch kann der Bedarf an Probenmaterial und auch der Zeitaufwand in der Diagnostik gesenkt werden. Bei einem von Henningson et al. (2016)<sup>153</sup> durchgeführten Vergleich des Quantikine ELISA von R&D Systems mit dem CXCL13-Test der Firma Mikrogen konnten keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität und Spezifität festgestellt werden<sup>153</sup>. Bei beiden Tests konnte über die CXCL13-Konzentration zwischen Neuroborreliose-Patienten und Patienten ohne Neuroborreliose unterschieden werden, wobei jedoch unterschiedliche Grenzwerte für die Unterscheidung verwendet wurden<sup>153</sup>. Auch bei anderen Studien wurden unterschiedliche Grenzwerte für zum Teil gleiche Tests, aber auch unterschiedliche Tests, bestimmt<sup>154</sup>. Bei dem *Borrelia neuroplex* wurde der Grenzwert bei 69,6 pg/mL festgesetzt. Damit konnte bei allen CSF-Proben von Neuroborreliose-Patienten eine erhöhte CXCL13-Konzentration gemessen werden. Jedoch lagen mit diesem Grenzwert auch bei Patienten ohne Neuroborreliose erhöhte Konzentrationen vor, wobei diese deutlich niedriger waren als die Konzentrationen bei einer Neuroborreliose. Zudem wurden deutlich höhere Konzentrationen berechnet als von der Neurobiobank des Universitätsklinikums Ulm übermittelt. Dies liegt vermutlich an der Stabilität des für die STD-Kurve verwendeten rekombinanten CXCL13. Dies wurde lyophilisiert geliefert und nach Herstellerangaben gelöst. Durch verlängerte Lagerungszeiten könnte es jedoch zu einer Denaturierung des CXCL13 gekommen sein, so dass bei den einzelnen STD-Kurvenpunkten eine höhere CXCL13-Konzentration angenommen wurde, als tatsächlich vorlag. Dadurch wäre auch die Konzentration in den Proben zu hoch berechnet worden. Um dies zu bestätigen sollte die Konzentration des für die STD-Kurve verwendeten rekombinanten CXCL13 nochmals mit einem kommerziellen CXCL13-Test bestimmt werden. Hier wäre ein allgemein gültiger WHO-Standard hilfreich. Dieser würde eine Angleichung der verschiedenen Labore und Tests ermöglichen.



Generell ist bei der Bestimmung der CXCL13-Konzentration zu beachten, dass eine erhöhte Konzentration auch bei anderen infektiösen und entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems, wie zum Beispiel einer tuberkulösen Meningitis<sup>55</sup> oder einem ZNS-Lymphom<sup>55,155</sup>, vorkommen kann<sup>56,149,156</sup>. Bei den meisten dieser Erkrankungen ist jedoch keine Differentialdiagnostik zu einer Neuroborreliose notwendig<sup>149</sup>. Lediglich bei einer Neurosyphilis ist eine Differentialdiagnostik sinnvoll, da auch hier die CXCL13-Konzentration erhöht ist<sup>57,156</sup> und eine Neuroborreliose dieser in ihrem klinischen Bild sehr ähnlich ist<sup>57</sup>.

#### 5.4.4 Differentialdiagnostik - Neurosyphilis

Die Neurosyphilis (Neurolues) ist eine Verlaufsform der Syphilis, welche durch den Erreger *Treponema pallidum ssp. pallidum* ausgelöst wird<sup>156</sup>. Bereits in den letzten Jahren konnte ein Anstieg an Infektionen in den westlichen Ländern beobachtet werden<sup>156,157</sup>. Sowohl bei einer Neuroborreliose als auch einer Neurosyphilis verläuft eine Infektion anfangs oft asymptomatisch. Die Diagnose erfolgt wie bei der Neuroborreliose über das klinische Bild, sowie Serum- und CSF-Analysen und den Nachweis spezifischer Antikörper<sup>57</sup>. Während bei der Neuroborreliose eine intrathekale IgM-Dominanz vorliegt, kommt es bei der Neurosyphilis hauptsächlich zu einer IgG-Synthese, wobei diese bei der parenchymatösen Neurosyphilis von einer intrathekalen IgM-Synthese begleitet wird<sup>94</sup>. Eine Dreiklassenreaktion wie bei der Neuroborreliose konnte bisher nicht nachgewiesen werden. So kommt es bei einer Neurosyphilis nur selten zu einer intrathekalen IgA-Synthese<sup>94</sup>.

Für eine Differentialdiagnostik zur Neurosyphilis wurden in den *Borrelia neuroplex* vier Antigene des Erregers *Treponema pallidum ssp. pallidum* integriert. Bei einem Vergleich von *Treponema*-positiven und -negativen Proben, konnten bei der IgG-Detektion deutliche Unterschiede in den MFI-Signalen festgestellt werden. Bei der IgM-Detektion zeigten sich keine Unterschiede. Eine Interpretation der Ergebnisse ist schwierig, da nicht bekannt ist, zu welchem Zeitpunkt der Infektion die Probennahme stattfand und welche Verlaufsform der Syphilis bei dem jeweiligen Patienten vorlag. CSF-Proben von Patienten mit einer Neurosyphilis standen nicht zur Verfügung, so dass eine Messung der CXCL13-Konzentration im Zusammenhang mit einer *Treponema*-Infektion nicht möglich war. Aus diesem Grund konnte der *Borrelia neuroplex* auch ausschließlich für die *Borrelia*-Antigene validiert werden und es kann daher nur für diese eine ausreichende Stabilität des Assays bestätigt werden.

### 5.5 Schlussfolgerung / Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit dem *Borrelia multiplex* gelungen ist einen stabilen multiplexen Assay zur Untersuchung der Antikörperantwort bei einer Borrelien-Infektion zu entwickeln. Durch seine Automatisierung eignet sich der *Borrelia*

multiplex hervorragend für effiziente Messungen im Hochdurchsatz, wobei bei kleineren Probensets auch eine manuelle Durchführung des Assays möglich ist. Durch die gleichzeitige IgG/IgM-Detektion entfällt die Notwendigkeit von Doppeltestungen. Dies spart nicht nur Zeit und Geld, sondern reduziert auch den Verbrauch von begrenztem Biomaterial. Darüber hinaus ist der Assay durch die verwendete xMAP-Technologie leicht modifizierbar und kann bei Bedarf schnell und einfach an verschiedene Anforderungen angepasst werden. So ist auch eine Kombination mit bereits entwickelten anderen multiplexen Pathogenassays, wie z.B. dem MultiCoV-Ab<sup>98</sup>, denkbar. Dadurch könnten Proben in Zukunft mit wenig Materialbedarf und geringem Zeitaufwand gleichzeitig auf verschiedene Pathogene untersucht werden.

Mit dem *Borrelia neuroplex* ist es zusätzlich gelungen einen vielversprechenden Assay zum verbesserten Nachweis einer Neuroborreliose zu entwickeln. Borrelien-spezifische Antikörper können hier nicht nur im Serum, sondern auch im CSF nachgewiesen werden. Zudem unterscheidet sich der Assay von auf dem Markt befindlichen Antikörpertests durch die parallele Quantifizierung des Chemokins CXCL13. Dieses gilt im CSF als Marker einer akuten Neuroborreliose und kann daher auch zur Kontrolle des Therapieverlaufs herangezogen werden. Für eine Differentialdiagnostik ist auch bei diesem Assay eine Integration von Antigenen anderer Krankheitserreger, wie z.B. der Neurosyphilis, möglich.

Alles in allem ist es damit gelungen zwei multiplexe Assays zur Analyse der humoralen Immunantwort bei einer Borrelien-Infektion zu entwickeln und validieren und somit einen Beitrag zur aktuellen Borreliose-Diagnostik zu leisten.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Müllegger, R. (2018). *Infektionen: Lyme-Borreliose, Leptospirose und Rückfallfieber*. In: Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie (eds G. Plewig, T. Ruzicka, R. Kaufmann, & M. Hertl), p. 215-231, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-49544-5\_14
- 2 Strle, F. & Stanek, G. (2009). *Clinical Manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis*. In: Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects (eds D. Lipsker & B. Jaulhac), p. 51-110, Karger. doi: 10.1159/isbn.978-3-8055-9115-7
- 3 Hunfeld, K.-P. (2020). *Borrelien*. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (eds S. Suerbaum, G.-D. Burchard, S. H. E. Kaufmann, & T. F. Schulz), p. 487-498, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-61385-6\_45
- 4 Brehmer-Andersson, E. (2006). *Lyme Borreliosis*. In: Dermatopathology (ed E. Brehmer-Andersson), p. 122-133, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/3-540-30244-1\_18
- 5 Péter, O. (2006). *La borréliose de Lyme : de l'érythème migrant à l'arthrite de Lyme*. Revue Medicale Suisse, Vol. 2. doi: -
- 6 Stanek, G. & Strle, F. (2018). *Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment*. FEMS Microbiology Reviews, Vol. 42. doi: 10.1093/femsre/fux047
- 7 Aberer, E. (2007). *Lyme borreliosis—an update*. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Vol. 5. doi: 10.1111/j.1610-0387.2007.06285.x
- 8 Hubálek, Z. (2009). *Epidemiology of Lyme Borreliosis*. In: Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects (eds D. Lipsker & B. Jaulhac), p. 31-50, Karger. doi: 10.1159/isbn.978-3-8055-9115-7
- 9 Sykes, R. A. & Makiello, P. (2017). *An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe*. Journal of Public Health, Vol. 39. doi: 10.1093/pubmed/fdw017
- 10 Orliková, H., Kybicová, K., Malý, M. & Kynčl, J. (2022). *Surveillance and epidemiology of Lyme borreliosis in the Czech Republic in 2018 and 2019*. Biologia, Vol. 77. doi: 10.1007/s11756-021-00868-w
- 11 Poggensee, G. et al. (2008). *Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, Vol. 51. doi: 10.1007/s00103-008-0703-6
- 12 Enkelmann, J. et al. (2018). *Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013–2017*. Scientific Reports, Vol. 8. doi: 10.1038/s41598-018-33136-0
- 13 Müller, I. et al. (2012). *Evaluating Frequency, Diagnostic Quality, and Cost of Lyme Borreliosis Testing in Germany: A Retrospective Model Analysis*. Clinical and Developmental Immunology, Vol. 2012. doi: 10.1155/2012/595427

- 14 Akmatov, M. K. *et al.* *Bundesweite und kleinräumige Kennzahlen zur Morbidität von Lyme-Borreliose in Deutschland anhand vertragsärztlicher Abrechnungsdaten, 2010 bis 2019.* Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi), Vol. 10.20364/VA-21.06
- 15 Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. & Strle, F. (2012). *Lyme borreliosis.* *The Lancet*, Vol. 379. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60103-7
- 16 Böhmer, M. M., Ens, K., Böhm, S., Heinzinger, S. & Fingerle, V. (2021). *Epidemiological Surveillance of Lyme Borreliosis in Bavaria, Germany, 2013–2020.* *Microorganisms*, Vol. 9. doi: 10.3390/microorganisms9091872
- 17 Steere, A. C. *et al.* (2016). *Lyme borreliosis.* *Nature Reviews Disease Primers*, Vol. 2. doi: 10.1038/nrdp.2016.90
- 18 Rizzoli, A. *et al.* (2011). *Lyme borreliosis in Europe.* *Eurosurveillance*, Vol. 16. doi: 10.2807/ese.16.27.19906-en
- 19 Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B. & Hu, L. T. (2012). *Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes.* *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 10. doi: 10.1038/nrmicro2714
- 20 Agüero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I. & Wormser, G. P. (2005). *Diagnosis of Lyme Borreliosis.* *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 18. doi: 10.1128/CMR.18.3.484–509.2005
- 21 Bamm, V. V., Ko, J. T., Mainprize, I. L., Sanderson, V. P. & Wills, M. K. B. (2019). *Lyme Disease Frontiers: Reconciling Borrelia Biology and Clinical Conundrums.* *Pathogens*, Vol. 8. doi: 10.3390/pathogens8040299
- 22 Anderson, C. & Brissette, C. A. (2021). *The Brilliance of Borrelia: Mechanisms of Host Immune Evasion by Lyme Disease-Causing Spirochetes.* *Pathogens*, Vol. 10. doi: 10.3390/pathogens10030281
- 23 Meriläinen, L., Herranen, A., Schwarzbach, A. & Gilbert, L. (2015). *Morphological and biochemical features of Borrelia burgdorferi pleomorphic forms.* *Microbiology*, Vol. 161. doi: 10.1099/mic.0.000027
- 24 Meriläinen, L., Brander, H., Herranen, A., Schwarzbach, A. & Gilbert, L. (2016). *Pleomorphic forms of Borrelia burgdorferi induce distinct immune responses.* *Microbes and Infection*, Vol. 18. doi: 10.1016/j.micinf.2016.04.002
- 25 Sapi, E. *et al.* (2012). *Characterization of Biofilm Formation by Borrelia burgdorferi In Vitro.* *PLOS ONE*, Vol. 7. doi: 10.1371/journal.pone.0048277
- 26 Sapi, E. *et al.* (2016). *Evidence of in vivo existence of Borrelia biofilm in borrelial lymphocytomas.* *European Journal of Microbiology and Immunology*, Vol. 6. doi: 10.1556/1886.2015.00049
- 27 Caimano, M. J., Drecktrah, D., Kung, F. & Samuels, D. S. (2016). *Interaction of the Lyme disease spirochete with its tick vector.* *Cellular Microbiology*, Vol. 18. doi: 10.1111/cmi.12609

- 28 Joshi, C. J., Ke, W., Drangowska-Way, A., O'Rourke, E. J. & Lewis, N. E. (2022). *What are housekeeping genes?* PLOS Computational Biology, Vol. 18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1010295
- 29 Lin, B., Short, S. A., Eskildsen, M., Klempner, M. S. & Hu, L. T. (2001). *Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of Borrelia burgdorferi: a complementation model in opp- Escherichia coli.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Vol. 1499. doi: 10.1016/S0167-4889(00)00121-X
- 30 Wang, X.-G. et al. (2004). *Analysis of Differences in the Functional Properties of the Substrate Binding Proteins of the Borrelia burgdorferi Oligopeptide Permease (opp) Operon.* Journal of Bacteriology, Vol. 186. doi: 10.1128/JB.186.1.51-60.2004
- 31 Cook, M. J. (2015). *Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment.* International Journal of General Medicine, Vol. 8. doi: 10.2147/IJGM.S73791
- 32 Petzke, M. & Schwartz, I. (2015). *Borrelia burgdorferi Pathogenesis and the Immune Response.* Clinics in Laboratory Medicine, Vol. 35. doi: 10.1016/j.cll.2015.07.004
- 33 Tracy, K. E. & Baumgarth, N. (2017). *Borrelia burgdorferi Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts.* Frontiers in Immunology, Vol. 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00116
- 34 Agüero-Rosenfeld, M. E. (2008). *Lyme Disease: Laboratory Issues.* Infectious Disease Clinics of North America, Vol. 22. doi: 10.1016/j.idc.2007.12.005
- 35 Šmit, R. & Postma, M. J. (2015). *Lyme borreliosis: reviewing potential vaccines, clinical aspects and health economics.* Expert Review of Vaccines, Vol. 14. doi: 10.1586/14760584.2015.1091313
- 36 Smith, A. J., Oertle, J. & Prato, D. (2014). *Chronic Lyme Disease: Persistent Clinical Symptoms Related to Immune Evasion, Antibiotic Resistance and Various Defense Mechanisms of <i>Borrelia burgdorferi.* Open Journal of Medical Microbiology, Vol. 4. doi: 10.4236/ojmm.2014.44029
- 37 Brissette, C. A. et al. (2009). *Borrelia burgdorferi infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen.* Infection and Immunity, Vol. 77. doi: 10.1128/iai.01133-08
- 38 Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2011). *Pathogen Recognition by the Innate Immune System.* International Reviews of Immunology, Vol. 30. doi: 10.3109/08830185.2010.529976
- 39 Murphy, K. & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie.* 9 edn, Springer Spektrum. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4
- 40 Kaufmann, S. H. E. (2009). *Antikörper und ihre Antigene.* In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (eds H. Hahn, S. H. E. Kaufmann, T. F. Schulz, & S. Suerbaum), p. 48-62, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-46362-7\_9

- 41 Mulisch, M. (2014). *Antikörper*. In: Verfahren der Immunlokalisation: Ein Überblick (ed M. Mulisch), p. 3-10, Springer Fachmedien Wiesbaden. doi: 10.1007/978-3-658-03829-8\_2
- 42 Wingren, C., Alkner, U. & Hansson, U.-B. *Antibody Classes*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons. doi: 10.1038/npg.els.0003985
- 43 Wang, G., Wormser, G. P. & Schwartz, I. (2001). *Borrelia burgdorferi*. In: Molecular Medical Microbiology (ed M. Sussman), p. 2059-2092, Academic Press. doi: 10.1006/bkmm.2001.0097
- 44 Olesen, K., Hejlesen, O., Dessau, R., Beltoft, I. & Trangeled, M. (2006). *Diagnosing Lyme disease - Tailoring patient specific Bayesian networks for temporal reasoning*. Third European Workshop on Probabilistic Graphical Models. Prague, Czech Republic
- 45 Rink, L., Kruse, A. & Haase, H. (2015). *Immunologie für Einsteiger*. 2 edn, Springer Spektrum. doi: 10.1007/978-3-662-44843-4
- 46 Herzer, P., Fingerle, V., Pfister, H.-W. & Krause, A. (2014). *Lyme-Borreliose*. Der Internist, Vol. 55. doi: 10.1007/s00108-013-3412-7
- 47 Berlit, P. (2014). *Polyneuropathien*. In: Basiswissen Neurologie (ed P. Berlit), p. 93-109, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-37784-6\_4
- 48 Wilske, B., Fingerle, V. & Schulte-Spechtel, U. (2007). *Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, Vol. 49. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00139.x
- 49 Dessau, R. B. et al. (2018). *To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis*. Clinical Microbiology and Infection, Vol. 24. doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.025
- 50 Eldin, C. et al. (2019). *Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis*. Médecine et Maladies Infectieuses, Vol. 49. doi: 10.1016/j.medmal.2018.11.011
- 51 Wilske, B. (2005). *Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis*. Annals of Medicine, Vol. 37. doi: 10.1080/07853890500431934
- 52 Rauer, S. & Kastenbauer, S. et al. (2018). *Neuroborreliose, S3-Leitlinie*. <[https://dnvp9c1uo2095.cloudfront.net/wp-content/uploads/2013/01/030071\\_LL\\_Neuroborreliose\\_2018.pdf](https://dnvp9c1uo2095.cloudfront.net/wp-content/uploads/2013/01/030071_LL_Neuroborreliose_2018.pdf)>, zu letzt aufgerufen am 28.08.2022
- 53 Wilske, B. & Fingerle, V. (2009). *Borrelia spp.* In: Mikrobiologische Diagnostik (eds B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, & P. Kimmig), p. 583-593, Georg Thieme Verlag. doi: 10.1055/b-0034-69296
- 54 Rupprecht, T. A. et al. (2005). *The chemokine CXCL13 (BLC): A putative diagnostic marker for neuroborreliosis*. Neurology, Vol. 65. doi: 10.1212/01.wnl.0000171349.06645.79
- 55 Schmidt, C. et al. (2011). *A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis*. Neurology, Vol. 76. doi: 10.1212/WNL.0b013e318211c39a

- 56 Rupprecht, T. A. *et al.* (2009). *The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis*. *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 6. doi: 10.1186/1742-2094-6-42
- 57 Gudowska-Sawczuk, M. & Mroczko, B. (2020). *Chemokine Ligand 13 (CXCL13) in Neuroborreliosis and Neurosyphilis as Selected Spirochetal Neurological Diseases: A Review of Its Diagnostic Significance*. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 21. doi: 10.3390/ijms21082927
- 58 Seifert, R. (2021). *Arzneistoffe zur Behandlung bakterieller Infektionen*. In: *Basiswissen Pharmakologie* (ed R. Seifert), p. 443-468, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-60504-2\_32
- 59 Essack, S. Y. (2001). *The Development of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Response to the Evolution of  $\beta$ -Lactamases*. *Pharmaceutical Research*, Vol. 18. doi: 10.1023/A:1012272403776
- 60 Aucott, J. N. (2015). *Posttreatment Lyme Disease Syndrome*. *Infectious Disease Clinics of North America*, Vol. 29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.012>
- 61 Ścieszka, J., Dąbek, J. & Cieślík, P. (2015). *Post-Lyme disease syndrome*. *Reumatologia*, Vol. 53. doi: 10.5114/reum.2015.50557
- 62 Dattwyler, R. J. & Gomes-Solecki, M. (2022). *The year that shaped the outcome of the OspA vaccine for human Lyme disease*. *npj Vaccines*, Vol. 7. doi: 10.1038/s41541-022-00429-5
- 63 Pfizer Inc. (2022). *An Efficacy, Safety, Tolerability, Immunogenicity, and Lot-Consistency Clinical Trial of a 6-Valent OspA-Based Lyme Disease Vaccine (VLA15) (VALOR)*. <<https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT05477524?distance=50&cond=NCT05477524&rank=1#locations>>, zu letzt aufgerufen am 19.08.2022
- 64 Kullberg, B. J., Vrijmoeth, H. D., van de Schoor, F. & Hovius, J. W. (2020). *Lyme borreliosis: diagnosis and management*. *BMJ*, Vol. 369. doi: 10.1136/bmj.m1041
- 65 Wormser, G. P. (2022). *A brief history of OspA vaccines including their impact on diagnostic testing for Lyme disease*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 102. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115572
- 66 Comstedt, P. *et al.* (2015). *Characterization and optimization of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis*. *Vaccine*, Vol. 33. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.095
- 67 Schuurs, A. H. W. M. & Van Weemen, B. K. (1977). *Enzyme-immunoassay*. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 81. doi: 10.1016/0009-8981(77)90410-7
- 68 Wellhausen, R. & Seitz, H. (2012). *Facing Current Quantification Challenges in Protein Microarrays*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2012. doi: 10.1155/2012/831347
- 69 Ellington, A. A., Kullo, I. J., Bailey, K. R. & Klee, G. G. (2010). *Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges*. *Clinical Chemistry*, Vol. 56. doi: 10.1373/clinchem.2009.127514

- 70 Poetz, O. *et al.* (2005). *Protein microarrays: catching the proteome*. Mechanisms of Ageing and Development, Vol. 126. doi: 10.1016/j.mad.2004.09.030
- 71 Luminex Corporation. (2022). Technology Information: xMAP® Technology At a Glance.
- 72 Luminex Corporation. (2019). Product Information Sheet MagPlex® Microspheres.
- 73 Luminex Corporation. (2021). System Information: Luminex xMAP® Instrument (RUO).
- 74 Burd, E. M. (2010). *Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases*. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 23. doi: 10.1128/cmr.00074-09
- 75 Andreasson, U. *et al.* (2015). *A practical guide to immunoassay method validation*. Frontiers in Neurology, Vol. 6. doi: 10.3389/fneur.2015.00179
- 76 European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. (2011).
- 77 U.S. Food and Drug Administration (FDA). Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry. FDA-2013-D-1020. (2018).
- 78 Ang, C. W., Notermans, D. W., Hommes, M., Simoons-Smit, A. M. & Herremans, T. (2011). *Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Vol. 30. doi: 10.1007/s10096-011-1157-6
- 79 Wager, B., Shaw, D. K., Groshong, A. M., Blevins, J. S. & Skare, J. T. (2015). *BB0744 Affects Tissue Tropism and Spatial Distribution of Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity, Vol. 83. doi: 10.1128/IAI.00828-15
- 80 Braune, B. & Berger, K. (2005). *The Influence of Depressive Mood on Activities of Daily Living and Health Care Utilization in the Elderly-The MEMO Study on the KORA Platform Augsburg*. Das Gesundheitswesen, Vol. 67. doi: 10.1055/s-2005-858236
- 81 Zeeb, M. *et al.* (2020). *Seropositivity for pathogens associated with chronic infections is a risk factor for all-cause mortality in the elderly: findings from the Memory and Morbidity in Augsburg Elderly (MEMO) Study*. GeroScience, Vol. 42. doi: 10.1007/s11357-020-00216-x
- 82 Gornyk, D. *et al.* (2021). *SARS-CoV-2 Seroprevalence in Germany*. Deutsches Ärzteblatt International, Vol. 118. doi: 10.3238/arztebl.m2021.0364
- 83 Manns, J. M. (2011). *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins*. Current Protocols in Microbiology, Vol. 22. doi: 10.1002/9780471729259.mca03ms22
- 84 Gallagher, S. R. (2012). *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, Vol. 6. doi: 10.1002/9780470089941.et0703s06
- 85 Cao, Y., Zhao, J. & Xiong, Y. L. (2016). *Coomassie Brilliant Blue-binding: a simple and effective method for the determination of water-insoluble protein surface hydrophobicity*. Analytical Methods, Vol. 8. doi: 10.1039/C5AY02630J



- 86 Hermanson, G. T. (2008). *Bioconjugate Techniques*. 2 edn, Academic Press. doi: -
- 87 Sigma-Aldrich. *Product Page: Sulfo-SMPB (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidophenyl)butyrate)*. <<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/aldrich/803243>>, zu letzt aufgerufen am 30.05.2022
- 88 Avery, G. (2019). *Biotin interference in immunoassay: a review for the laboratory scientist*. *Annals of Clinical Biochemistry*, Vol. 56. doi: 10.1177/0004563219842231
- 89 Dundas, C. M., Demonte, D. & Park, S. (2013). *Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97. doi: 10.1007/s00253-013-5232-z
- 90 Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: -
- 91 Fleurence, J. (2003). *R-Phycoerythrin from red macroalgae : strategies for extraction and potential application in biotechnological*. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, Vol. 1. doi: -
- 92 Chattopadhyay, P. K. et al. (2012). *Brilliant Violet Fluorophores: A New Class of Ultrabright Fluorescent Compounds for Immunofluorescence Experiments*. *Cytometry Part A*, Vol. 81. doi: 10.1002/cyto.a.22043
- 93 GraphPad QuickCalc. <<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1.cfm>>, zu letzt aufgerufen am 09.08.2022
- 94 Uhr, M. & Reiber, H. (2020). *Liquordiagnostik*. In: *Klinische Neurologie* (ed P. Berlit), p. 213-244, Springer Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-60676-6\_22
- 95 Reiber, H., Ressel, C. B. & Spreer, A. (2013). *Diagnosis of neuroborreliosis – Improved knowledge base for qualified antibody analysis and cerebrospinal fluid data pattern related interpretations*. *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, Vol. 19. doi: 10.1016/j.npbr.2013.10.004
- 96 Jacek, E. et al. (2016). *Epitope-Specific Evolution of Human B Cell Responses to Borrelia burgdorferi VlsE Protein from Early to Late Stages of Lyme disease*. *The Journal of Immunology*, Vol. 196. doi: 10.4049/jimmunol.1501861
- 97 Prot pi. <<https://www.protpi.ch/>>, zu letzt aufgerufen am 09.08.2022
- 98 Becker, M. et al. (2021). *Exploring beyond clinical routine SARS-CoV-2 serology using MultiCoV-Ab to evaluate endemic coronavirus cross-reactivity*. *Nature Communications*, Vol. 12. doi: 10.1038/s41467-021-20973-3
- 99 Planatscher, H. et al. (2013). *Systematic reference sample generation for multiplexed serological assays*. *Scientific Reports*, Vol. 3. doi: 10.1038/srep03259
- 100 Gerritzen, A. & Brandt, S. (2012). *Serodiagnosis of Lyme borreliosis with bead based immunoassays using multiplex technology*. *Methods*, Vol. 56. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.02.007

- 101 Kalish, R. A. *et al.* (2001). *Persistence of Immunoglobulin M or Immunoglobulin G Antibody Responses to Borrelia burgdorferi 10–20 Years after Active Lyme Disease*. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 33. doi: 10.1086/322669
- 102 Glatz, M., Golestani, M., Kerl, H. & Müllegger, R. R. (2006). *Clinical Relevance of Different IgG and IgM Serum Antibody Responses to Borrelia burgdorferi After Antibiotic Therapy for Erythema Migrans: Long-term Follow-up Study of 113 Patients*. *Archives of Dermatology*, Vol. 142. doi: 10.1001/archderm.142.7.862
- 103 Stanek, G. *et al.* (2011). *Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe*. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 17. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03175.x
- 104 Lomholt, H., Lebech, A. M., Hansen, K., Brandrup, F. & Halkier-Sørensen, L. (2000). *Long-term serological follow-up of patients treated for chronic cutaneous borreliosis or culture-positive erythema migrans*. *Acta Dermato-Venereologica*, Vol. 80. doi: 10.1080/000155500459312
- 105 Leeflang, M. *et al.* (2016). *The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis*. *BMC Infectious Diseases*, Vol. 16. doi: 10.1186/s12879-016-1468-4
- 106 Tjernberg, I., Krüger, G. & Eliasson, I. (2007). *C6 peptide ELISA test in the serodiagnosis of Lyme borreliosis in Sweden*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 26. doi: 10.1007/s10096-006-0239-3
- 107 Wormser, G. P. *et al.* (2013). *Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 75. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.09.003
- 108 Rouhiainen, M. *et al.* (2021). *C6 peptide enzyme immunoassay in Lyme borreliosis serology*. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 180. doi: 10.1016/j.mimet.2020.106122
- 109 Chandra, A., Latov, N., Wormser, G. P., Marques, A. R. & Alaedini, A. (2011). *Epitope Mapping of Antibodies to VlsE Protein of Borrelia burgdorferi in Post-Lyme Disease Syndrome*. *Clinical Immunology*, Vol. 141. doi: 10.1016/j.clim.2011.06.005.
- 110 Eicken, C. *et al.* (2002). *Crystal Structure of Lyme Disease Variable Surface Antigen VlsE of Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277. doi: 10.1074/jbc.M201547200
- 111 Liang, F. T. & Philipp, M. T. (1999). *Analysis of Antibody Response to Invariable Regions of VlsE, the Variable Surface Antigen of Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, Vol. 67. doi: 10.1128/iai.67.12.6702-6706.1999
- 112 Goettner, G. *et al.* (2005). *Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues*. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43. doi: 10.1128/jcm.43.8.3602-3609.2005

- 113 Ma, B., Christen, B., Leung, D. & Vigo-Pelfrey, C. (1992). *Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by Western Immunoblot: Reactivity of Various Significant Antibodies against Borrelia burgdorferi*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 30. doi: 10.1128/jcm.30.2.370-376.1992
- 114 Engstrom, S. M., Shoop, E. & Johnson, R. C. (1995). *Immunoblot Interpretation Criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 33. doi: 10.1128/jcm.33.2.419-427.1995
- 115 Roessler, D., Hauser, U. & Wilske, B. (1997). *Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of Borrelia burgdorferi sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 35. doi: 10.1128/jcm.35.11.2752-2758.1997
- 116 Heikkilä, T. et al. (2002). *Species-Specific Serodiagnosis of Lyme Arthritis and Neuroborreliosis Due to Borrelia burgdorferi Sensu Stricto, B. afzelii, and B. garinii by Using Decorin Binding Protein A*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 40. doi: 10.1128/jcm.40.02.453-460.2002
- 117 Jobe, D. A., Lovrich, S. D., Schell, R. F. & Callister, S. M. (2003). *C-Terminal Region of Outer Surface Protein C Binds Borreliacidal Antibodies in Sera from Patients with Lyme Disease*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Vol. 10. doi: 10.1128/cdli.10.4.573-578.2003
- 118 Kumaran, D. et al. (2001). *Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi*. The EMBO Journal, Vol. 20. doi: 10.1093/emboj/20.5.971
- 119 Eicken, C. et al. (2001). *Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein C from Borrelia burgdorferi*. Journal of Biological Chemistry, Vol. 276. doi: 10.1074/jbc.M010062200
- 120 Liu, Y. et al. (2020). *Theoretical Research on Excited States: Ultraviolet and Fluorescence Spectra of Aromatic Amino Acids*. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, Vol. 12. doi: 10.1007/s12539-020-00395-3
- 121 Ghisaidoobe, A. B. T. & Chung, S. J. (2014). *Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques*. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 15. doi: 10.3390/ijms151222518
- 122 Rasiah, C., Schiltz, E., Reichert, J. & Vogt, A. (1992). *Purification and characterization of a tryptic peptide of Borrelia burgdorferi flagellin, which reduces cross-reactivity in immunoblots and ELISA*. Journal of General Microbiology, Vol. 138. doi: 10.1099/00221287-138-1-147
- 123 Racine, R. & Winslow, G. M. (2009). *IgM in microbial infections: Taken for granted?* Immunology Letters, Vol. 125. doi: 10.1016/j.imlet.2009.06.003
- 124 Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. (2010). *The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator*. Nature Reviews Immunology, Vol. 10. doi: 10.1038/nri2849
- 125 Bläss, S., Engel, J. & Burmester, G. (2001). *Der Immunologische Homunculus bei der rheumatoiden Arthritis*. Zeitschrift für Rheumatologie, Vol. 60. doi: -

- 126 Biesen, R., Burmester, G. R. & Hiepe, F. (2014). *Positiver Rheumafaktor oder positive ANA als Zufallsbefund*. *Der Internist*, Vol. 55. doi: 10.1007/s00108-014-3588-5
- 127 Lager, M. *et al.* (2019). *Serological diagnostics of Lyme borreliosis: comparison of assays in twelve clinical laboratories in Northern Europe*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 38. doi: 10.1007/s10096-019-03631-x
- 128 Du Prel, J.-B., Röhrig, B. & Weinmayr, G. (2010). *Was ist Epidemiologie?* In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* (eds G. Duncker & C. Meltendorf), Georg Thieme Verlag. doi: 10.1055/s-0030-1250555
- 129 Haidinger, G. (2016). *Grundlagen der Epidemiologie*. *Zeitschrift für Pneumologie*, Vol. 13. doi: 10.1007/s10405-015-0018-x
- 130 Van Elslande, J. *et al.* (2021). *Longitudinal follow-up of IgG anti-nucleocapsid antibodies in SARS-CoV-2 infected patients up to eight months after infection*. *Journal of Clinical Biology*, Vol. 136. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104765
- 131 Anand, S. P. *et al.* (2021). *Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset*. *Cell Reports Medicine*, Vol. 2. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100290
- 132 Becker, M. *et al.* (2021). *Immune response to SARS-CoV-2 variants of concern in vaccinated individuals*. *Nature Communications*, Vol. 12. doi: 10.1038/s41467-021-23473-6
- 133 Wilking, H., Fingerle, V., Klier, C., Thamm, M. & Stark, K. (2015). *Antibodies against Borrelia burgdorferi sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011*. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 21. doi: 10.3201/eid2101.140009
- 134 Woudenberg, T. *et al.* (2020). *Dynamics of Borrelia burgdorferi-Specific Antibodies: Seroconversion and Seroreversion between Two Population-Based, Cross-Sectional Surveys among Adults in Germany*. *Microorganisms*, Vol. 8. doi: 10.3390/microorganisms8121859
- 135 Wilhelmsson, P. *et al.* (2016). *A prospective study on the incidence of Borrelia burgdorferi sensu lato infection after a tick bite in Sweden and on the Åland Islands, Finland (2008–2009)*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Vol. 7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.08.009
- 136 Wilking, H. & Stark, K. (2014). *Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009–2012*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Vol. 5. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.10.010
- 137 Olweus, D. (1989). *Prevalence and Incidence in the Study of Antisocial Behavior: Definitions and Measurements*. In: *Cross-National Research in Self-Reported Crime and Delinquency* (ed M. W. Klein), p. 187-201, Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-009-1001-0\_9
- 138 Brugger, K. *et al.* (2016). *A Density Map of the Tick-Borne Encephalitis and Lyme Borreliosis Vector Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) for Germany*. *Journal of Medical Entomology*, Vol. 53. doi: 10.1093/jme/tjw116

- 139 Coors, A. et al. (2022). *Regional seropositivity for Borrelia burgdorferi and associated risk factors: findings from the Rhineland Study, Germany*. Parasites & Vectors, Vol. 15. doi: 10.1186/s13071-022-05354-z
- 140 Linard, C. et al. (2007). *Determinants of the geographic distribution of Puumala virus and Lyme borreliosis infections in Belgium*. International Journal of Health Geographics, Vol. 6. doi: 10.1186/1476-072x-6-15
- 141 Buczek, A., Rudek, A., Bartosik, K., Szymanska, J. & Wójcik-Fatla, A. (2009). *Seroepidemiological study of Lyme borreliosis among forestry workers in southern Poland*. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, Vol. 16. doi: -
- 142 Robert Koch-Institut (RKI). Epidemiologisches Bulletin 16 / 2001. (2001).
- 143 Weisshaar, E. et al. (2006). *Epidemiology of Tick Bites and Borreliosis in Children Attending Kindergarten or So-Called "Forest Kindergarten" in Southwest Germany*. Journal of Investigative Dermatology, Vol. 126. doi: 10.1038/sj.jid.5700160
- 144 Johanson, C. E. et al. (2008). *Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease*. Cerebrospinal Fluid Research, Vol. 5. doi: 10.1186/1743-8454-5-10
- 145 Reiber, H. & Peter, J. B. (2001). *Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs*. Journal of Neurological Sciences, Vol. 184. doi: 10.1016/s0022-510x(00)00501-3
- 146 Ljøstad, U., Skarpaas, T. & Mygland, Å. (2007). *Clinical usefulness of intrathecal antibody testing in acute Lyme neuroborreliosis*. European Journal of Neurology, Vol. 14. doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.01799.x
- 147 Djukic, M. et al. (2012). *Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis*. Journal of Neurology, Vol. 259. doi: 10.1007/s00415-011-6221-8
- 148 Blanc, F. et al. (2007). *Relevance of the antibody index to diagnose Lyme neuroborreliosis among seropositive patients*. Neurology, Vol. 69. doi: 10.1212/01.wnl.0000269672.17807.e0
- 149 Rupprecht, T. A., Lechner, C., Tumani, H. & Fingerle, V. (2014). *CXCL13 als Biomarker der akuten Neuroborreliose. Überprüfung des prädiktiven Wertes in der klinischen Routine*. Der Nervenarzt, Vol. 85. doi: 10.1007/s00115-014-4020-z
- 150 Ljøstad, U. & Mygland, A. (2008). *CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis*. Journal of Neurology, Vol. 255. doi: 10.1007/s00415-008-0785-y
- 151 Hytönen, J. et al. (2014). *CXCL13 and neopterin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with Lyme neuroborreliosis and other diseases that cause neuroinflammation*. Journal of Neuroinflammation, Vol. 11. doi: 10.1186/1742-2094-11-103
- 152 Rupprecht, T. A. et al. (2007). *Borrelia garinii Induces CXCL13 Production in Human Monocytes through Toll-Like Receptor 2*. Infection and Immunity, Vol. 75. doi: 10.1128/iai.01642-06

- 
- 153 Henningsson, A. J., Gyllemark, P., Lager, M., Skogman, B. H. & Tjernberg, I. (2016). *Evaluation of two assays for CXCL13 analysis in cerebrospinal fluid for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis*. *APMIS*, Vol. 124. doi: 10.1111/apm.12596
- 154 Lintner, H. *et al.* (2020). *Sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid CXCL13 for diagnosing Lyme neuroborreliosis - a study on 1410 patients and review of the literature*. *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 414. doi: 10.1016/j.jns.2020.116843
- 155 Rubenstein, J. L. *et al.* (2013). *CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma*. *Blood*, Vol. 121. doi: 10.1182/blood-2013-01-476333
- 156 Dersch, R. *et al.* (2015). *The chemokine CXCL13 is elevated in the cerebrospinal fluid of patients with neurosyphilis*. *Fluids and Barriers of the CNS*, Vol. 12. doi: 10.1186/s12987-015-0008-8
- 157 Klein, M. *et al.* (2020). *German guidelines on the diagnosis and treatment of neurosyphilis*. *Neurological Research and Practice*, Vol. 2. doi: 10.1186/s42466-020-00081-1

## 7 Anhang

<b>UniProt-Sequenzen .....</b>	<b>136</b>
Sequenzen I: BmpA. ....	136
Sequenzen II: DbpA. ....	136
Sequenzen III: OppA-2.....	137
Sequenzen IV: OspA.....	138
Sequenzen V: OspC.....	138
Sequenzen VI: p41.....	139
Sequenzen VII: p83/100.....	140
Sequenzen VIII: VisE. ....	141
<b>Tabellen.....</b>	<b>142</b>
<b>Assay-Präzision des <i>Borrelia multiplex</i>.....</b>	<b>142</b>
Tabelle 7-1: Cohen's Kappa Koeffizienten aus dem Vergleich des <i>Borrelia multiplex</i> mit kommerziellen Borreliose-Tests.....	142
<b>Messung von Serum-Proben der MuSPAD-Studie.....</b>	<b>143</b>
Tabelle 7-2: Absolute Werte und Prozente aus der Analyse von Serum-Proben der MuSPAD-Studie.....	143
<b>Abbildungen .....</b>	<b>144</b>
<b>Probenmessungen mit kommerziellen Borreliose-Tests .....</b>	<b>144</b>
Abbildung 7-1: Probenmessung mit kommerziellen Borreliose-Tests. ....	144
<b>Proteinanalysen der <i>Borrelia</i>-Antigene .....</b>	<b>145</b>
Abbildung 7-2: Proteinanalysen des Antigens BmpA - PKo. ....	145
Abbildung 7-3: Proteinanalysen des Antigens DbpA - ZS7.....	145
Abbildung 7-4: Proteinanalysen des Antigens DbpA - 20047.....	146
Abbildung 7-5:Proteinanalysen des Antigens DbpA - PKo.....	146
Abbildung 7-6: Proteinanalysen des Antigens DbpA - PBi.....	147
Abbildung 7-7: Proteinanalysen des Antigens OspA - PKo.....	147
Abbildung 7-8: Proteinanalysen des Antigens OppA-2 - PBi.....	148

---

Abbildung 7-9: Proteinanalysen des Antigens OspC - B31.....	148
Abbildung 7-10: Proteinanalysen des Antigens OspC - 20047.....	149
Abbildung 7-11: Proteinanalysen des Antigens OspC - A14S.....	149
Abbildung 7-12: Proteinanalysen des Antigens OspC - PKo.....	150
Abbildung 7-13: Proteinanalysen des Antigens OspC - PBi.....	150
Abbildung 7-14: Proteinanalysen des Antigens p41i - PKo.....	151
Abbildung 7-15: Proteinanalysen des Antigens p83/100 - PKo.....	151
Abbildung 7-16: Proteinanalysen des Antigens VlsE - B31.....	152
<b>Reproduzierbarkeit der Immobilisierung.....</b>	<b>153</b>
Abbildung 7-17: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - II.....	153
Abbildung 7-18: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - III.....	154
<b>SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle der finalen Antigen-Batches.....</b>	<b>155</b>
Abbildung 7-19: Reinheitskontrolle der final verwendeten Antigen-Batches.....	155
<b>FLEXMAP 3D versus INTELLIFLEX.....</b>	<b>156</b>
Abbildung 7-20: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - II. ....	156
Abbildung 7-21: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - III. ....	157
Abbildung 7-22: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - II. ....	158
Abbildung 7-23: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - III. ....	159
Abbildung 7-24: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM- Detektion - II.....	160
Abbildung 7-25: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM- Detektion - III.....	161
<b>Parallelität der Probenverdünnung - Borrelia multiplex.....</b>	<b>162</b>
Abbildung 7-26: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - II.....	162
Abbildung 7-27: Parallelität der Probenverdünnung im Borrelia multiplex - III.....	163



---

<b>Assay-Automatisierung des Borrelia multiplex .....</b>	<b>164</b>
Abbildung 7-28: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - II.....	164
Abbildung 7-29: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - III.....	165
<b>Erweiterung des 2-Schritt-Assays zur IgG/IgM-Detektion .....</b>	<b>167</b>
Abbildung 7-30: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay-Formaten - II.....	167
Abbildung 7-31: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay-Formaten - III.....	168
<b>Parallelität der Probenverdünnung - Borrelia neuroplex.....</b>	<b>169</b>
Abbildung 7-32: Parallelität der CSF-Probenverdünnung Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - II.....	169
Abbildung 7-33: Parallelität der CSF-Probenverdünnung Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - III.....	170
Abbildung 7-34: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex - II. ....	171
Abbildung 7-35: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im Borrelia neuroplex - III. ....	172

## UniProt-Sequenzen

Die Sequenzen wurden zuletzt am 09.06.2022 auf der Seite der UniProt-Datenbank (<https://beta.uniprot.org/>) abgefragt.

### Sequenzen I: BmpA.

B. burgdorferi s.s. (Q45010)	MNKLILLLESIVFLSCSGKGSLEGPVSLIIDGTFDDKSFNESALNGVKKVEEFKIELVLKESSNYSLSLEGLKDGSDLIWLIIGYRFSVDVAKVA ALQNPDMKYAIIIDPIYSNDPIPANLVGMTFRAQEGAFLTGYIAAKLSKTGKIGFLGGIEGEIVDAFRYGYEAGAKYANKDIKISTQYIGSFADLEAGRSV ATRMYSDEIDIIHHAAGLGGIGAEIVAKELGSGHYIIGVDEDDQYALAPDNVITSTTKDVGRALNIFTSNHLKTNTEFEGGLINYGLKEGVVGFVRNPKMI SFELEKEIDNLSKIIINKEIIVPSNKESYEKFLKEFI
B. garinii (B7XT52)	MHKLFLILFECIIFLSCSGKDSLESIGIPKVSIIIDGTFDDKSFNESALNGIKVKEEFKELVLKESSTNSYLSLEGLKDGSDLIWLIIGYKFGDVAKAV SLQNPDMKYAIIIDPIYSNDPIPANLVGMTFRAQEGAFLTGYIAAKVSKTSGKIGFLGGIAGEIVDAFRYGYEAGAKYANKDIKISTHYIGSFADLEAGRSV ATKMYSDDGIDIIHHAAGLGGIGAEIVAKELGSGHYIIGVDEDDQYALAPNNVITSSSTKDVGRALNIFTSNHLKTNTEFEGGLINYGLKEGVVGFVRNPKIIP FELEKEIDNLSKIIINKEIIVPYNKESYEKFLKE
B. afzelii (Q0SND0)	MNKLILLFEGVIFLSCSGKSGLESIGIPKVSIVIDGTFDDKSFNESALNGVKKVEEFKIELVLKESSTNSYLSLEGLKDGSDLIWLIIGYKFSVDVAKA VSLQNSEMKYAIIDPVYSNEPIPANLVGMTFRAQEGAFLTGYIAAKVSKTSGKIGFLGGIEGDIVDAFRYGYEAGAKYANKDIKIFSQYIGSFADLEAGRSV VATKMYSDDGIDIIHHAAGLGGIGAEIVAKELGSGHYIIGVDEDDQYALAPNNVITSTTKDVGRSLNLFSTSNLKTNTFEGGLINYGLKEGVVGFVRNPK MIPFEVEKEIDSLSKIIINKEIVIPYNKESYEKFLKEFI
B. spielmanii (C0APZ2)	MNKLILLFEGIIFLSCSGDKGLENKIPKVSIIIDGTFDDKSFNESALNGVKKVEEFKIELVLKESSTNSYVSDLEGLKDGSDLIWLIIGYKFSVDVAKAV SLQNSEMKYAIIDPVYSNEPIPANLVGMTFRAQEGAFLTGYIAKVSKTGKIGFLGGIEGDIVDAFRYGYEAGAKYANKDIKIFSQYIGSFADIEAGRSV ATKMYSDDGIDIIHHAAGLGGIGAEIVAKELGSGHYIIGVDEDDQYALAPNNVITSSSTKDVGRSLNLFSTSNLKTNTNFEGGLINYGLKEGVVGFVRNPKMI PFEVEKEIDSLSGKIIINKEIVIPYNKESYEKFLKEFL
B. bavariensis (Q661N6)	MNKLILLFECIIFLSCSGKGSLESEIPKVSIIIDGTFDDKSFNESALNGIKVKEEFKIEPIVLKESSTNSYLSLEGLKDTGSDLIWLIIGYKFSVDVAKSV SLQNPDIKYAIIDPVYSNEPIPANLVGMTFRSQEGAFLTGYIAAKVSKTSGKIGFLGGIEGEIVDAFRYGYEAGAKYANKDIKISAYYIGSFADLEAGRSVA TKMYSDDGIDIIHHAAGLGGIGAEIVAKELGSGHYIIGVDDQYALAPNNIIT SATKDVGRSLNIFTSNLYLKTNTFEGGLINYGLKEGVVGFKNPKMIPF ELEKEIDNLSKIIINKEIIVPYNKESYEKFIKE

### Sequenzen II: DbpA.

B. burgdorferi s.s. (A0A0H3C0P7)	MNKYQKTFKIFNFKNLLKLLVALISGLKGETKIILERSAKDIIDEINKIKKDAADNNVNFAAFEDKDTGSKVSENSFILEAKMRGTTVAEKFVTAIEGE ATKLKKTGSSGSEFSAMYNMILEVSGP LLEELVLRMTKTVTDAAEQHP TTTAEGILEIAKIMTKLQRVHTKNYCALKKENP SFTDEKCKNN
B. garinii (Q9ZH83)	MTKYIKNILKLSIVSLLVACGLTGKARLESSVKDITDVLKQARKDAQAEGARLEDFQIGKTGGKVA GPKIIKAAKIRVIELSEKFVKEIKEEA INLKENTGI GKVDKDLLKDMYMFMLKAAEALEELGLQRMKKTVDANDETPATTADGIIAIAASKINDKLQKIKNKQ
B. afzelii (Q9ZH93)	MIKYNKIILTLTLLASLLAACSLTGKARLESSVKDITNEIDKAIKAAKADAGVNTDAFTETQTGGKVAGSQIRDAKKLVADLTIEFLKATEEETITFKENGAG EDEFSGIYDLIYRTAEAVEKIGMVKQAVEAAAKENPKTTANGIIEIVKVMKAKVENIKEKQTKNQK
B. spielmanii (C0RC32)	MNKYTKNLLKLSLLVACSLTGKAKLESSVKDITNEIDKAIKAEQEGVDTNAFTDQKTGAKMGGPKTREAKLRIALTLQFLKETKEEA IKLKEYG AGEDEFKELYELMLKISKAVEGIGIQNMTATVSMGIVENPPTTAERVIEIAINTIESKLLKKIETKQ
B. bavariensis (Q6ASK4)	MTKYIKNLLKLTIVGLLVACSLTGKARLESSVKDITDEIDKAIKAEIADGVKLNLEENKTKGAKKGGPQIRDAKIRVINLSVKFLKEIEEA INLKDNVGM NKVDKDLLKDMYDLMLNAAAGSLQLQEMIKTVTQAAEKTPPTTVEGILMIANTIEDKLIKIKGQETNKK

## Sequenzen III: OppA-2.

B. burgdorferi s.s. (A0A0H3C4D2)	MKLQKLLFLIIFLFLFLLCCNKEEKKKEGVSFKISLGAEPSSLDPQLADDNVGSKMIDTMFKGLITGNPNTGGNKPGGLAKGWDISSDGTVYTFNLRREKITWSDGVAITAEGIRKSYLR ILNKETGSKYVEMVKSIVKNGQKYFDGQVTDSELGIRAIDEKTLLEITLESKPYPYFIDMLVHQSFIPVHVTEKYGQNWTSPEMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNDKYYSNE VELEEITFTTNDSSAYKMYENEELDAIFGSDIKNLKRSDYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDNVIRKALTLAIDRETLTYKVLNDNGTTPTRRATPNFSSSYAKSLELFPN EIAKTLAEAGYPNGNGFPILKLYNTNEANKKICEFIQNWKKLNIDVELENEEWTTYLNTKANGNYEIRAGWIGDYADPLTFLSIFTQGYTQFSSHNSNPEYNELIKKSDLE ELDPKRDILRQAEIIIIEKDFPIAPIYIYGNSYLFNRDKWTGWNTNILERFDLSQLKLNK
B. garinii (B7XT00)	MKLQKLLFLIIFLFLFLLCCSKEKAKEGVSFKISLGSSEPSLDPQLAEDNVASKMIDTMFRGLITGDPNTGGNRPGLAKSWNISPDGTVYFTLREKITWSDGVAITAEGIRKSYLR ILNKETGSKYVEMVKSIAKNGQKYFDEQVSDSEVGIRAIDEKTLLEITLESKPYPYFIDMLVHQSFIPVHVTEKYGQSWTSPENMVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNDKYYSNEV EVQEITFTTNDSSAYKMYENKELDAIFVSPDLIKDLKLRNDYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDNVIRKALTLAIDRETLTYKVLNDNGTTPTRRATPNFSSSYAKNLELFPN EIAKTLAEAGYPNGNGFPILKLYNTSDANKKICEFIQNWKKLNIDVELENEEWTTYLNTKSNNGYEIRAGWIGDYADPATFLSIFTQGYTQFSSHNSNPEYNELIKKSDLE LELDPKRDILRQAEIIIIEKDFPIAPIYIYGNSYLFNRDKWTGWNTNISERFDLSQLKLNK
B. afzelii (Q0SNI3)	MKLQKLLFLIIFLFLFLLCCNKEEKKKEGVSFKISLGAEPSSLDPQLADDNVGSKMIDTMFKGLITGDPNTGGNKPGGLAKSWDISPDGTVYFTLREKITWSDGVAITAEGIRKSYLR LNKETSNSYSEMVKSTIKNGQKYFDGQVSDSELGIRAIDEKTLLEITLESKPYPYFIDMLVHQSFIPVHVTEKYGQSWTNPENIVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNDKYYSNQVE VQEITFTTNDSSAYKMYENKELDAIFSAIPDLIKDLKLRSDYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDNVIRKALTLAIDRETLTYKVLDDGGTTPTRRATPNFSSSYAKNLELFPN AKTLAEAGYPNGNGFPILKLYNTSEAHKICEFIQNWKKLNIDVELENEEWTTYLNTKSNNGYEIRAGWIGDYADPLTFLSILTHGYTQFSSHNSNPEYNELIKKSDLE DPIKRDILRQAEIIIIEKDFPIAPIYIYGNSYLFNRDKWTGWNTNITERFDLSQLKLNK
B. spielmanii (C0AQB8)	MKLQKLLFSIIFLFLFLLCCNKEEKKKEGVSFKISLGAEPSSLDPQLADDNVGSKMIDTMFRGLITGDPNTGGNKPGGLAKSWDISPDGTVYFTLREKITWSDGVAITAEGIRKSYLR RILNKETGSNYAEMVKSTIKNGQKYFDEQVSDSELGIRAIDEKTLLEITLESKPYPYFIDMLVHQSFIPVHVTEKYGQSWTSPENIVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNDKYYSKEV ELQEAFTTNDSSAYKMYENKELDAIFGTPDLIKDLKLRSDYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDNVIRKALTLAIDRETLTYKVLNDNGTTPTRRATPNFNSYAKNLELFPN IAKTLAEAGYPNGNGFPVFKLYNTNESHKKICEFIQNWKKLNIDVELENEEWTTYLNTKASNGYEIRAGWIGDYADPLTFLSIFTQGYTQFSSHNSNPEYNELIKKSDLE LDPIKRDILRQAEIIIIEKDFPIAPIYIYGNSYLFNRDKWTGWNTNITERFDLSQLKLNK
B. bavariensis (A0A716GW20)	MKLQKLLFSVIFLFLFLLCCNKEEKKKEGVSFKISLGSSEPSLDPQLADDNVGSKMIDTMFRGLITGDPNTGGNKPGGLAKSWDISPDGTVYFTLREKITWSDGVAITAEGIRKSYLR LNKETSNSYSEMVKSTIKNGQKYFDGQVSDSELGIRAIDEKTLLEITLESKPYPYFIDMLVHQSFIPVHVTEKYGQSWTSPENIVTSGPFKLERIPNEKYVFEKNDKYYSNQVE VQEITFTTNDSSAYKMYENKELDAIFGSDIKNLKRSDYSSAVNAIFYAFNTHIKPLDNVIRKALTLAIDRETLTYKVLNDNGTTPTRRATPNFSSSYAKNLELFPN AKTLAEAGYPNGNGFPILKLYNTSEAHKICEFIQNWKKLNIDVELENEEWTTYLNTKSNNGYEIRAGWIGDYADPLTFLSIFTQGYTQFSSHNSNPEYNELIKKSDLE DPIKRDILRQAEIIIIEKDFPIAPIYIYGNSYLFNRDKWTGRNTNITERFDLSQLKLNK

**Sequenzen IV: OspA.**

B. burgdorferi s.s. (P0CL66)	MKYYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVLPGEMKVLVSKENKDGKYLDIATVDKLELEKGTSDKNNGSGVLEGVKADKSKVKLTISDDLGGQTTLEVFKEDEGKTLVSKKVT SKDKSSTEEKFNEKGEVSEKIITRADGTRLEYTGIKSDGSGKAKEVLKGYVEGLTAEKTTLVVKEGTVTLTKNISKSGEVSELNDTSSAATKTAAMNSGTSTLTIITVNSK KTKDLVFTKENTITVQYDSNGTKLEGSVAEIKLDEIKNALK
B. garinii (D5LH11)	MKYYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVLPGGMTVLVSKEDKDGKYSLEATVDKLELEKGTSDKNNGSGTLEGEKTDKSKVKLTIADDSLQTKFEIFKEDGKTLVSKKVT LKDKSSTEEKFNEKGETSEKTIVRANGTRLEYTDIKSDGSGKAKEVLKDFLEGLTAAADKTTLVKTEGTVLTKNILKSGEITVALDDSDTTQATKKTGWDSKSTLTIISVNSQ KTKNLVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGGKAVEIKLDELKNALK
B. afzelii (Q0SLZ0)	MKYYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSASVDLPGEMKVLVSKEDKDGKYSKATVDKLELEKGTSDKDNNGSGVLEGTDDKSKAKLTIADDSKTTFFELFKEDGKTLVSRKVS SKDKTSTDEMFNEKGEAKTMTRENGTKLEYTEMKSDGTGKAKEVLKFTLEKGVANDKVTLEKGVTVLTKSKEIAKSGEITVALNDTNTTQATKKTGAWDSKSTLTIISVN SKTTQLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGGTAVEIKLDELKNALK
B. spielmanii (C0RC24)	MKYYLLGIGLILALIAACKQNVSGLDEKNSVSVDPGELKVLVSKEDKDGKYSLMATVDKLELEKGTSDKNDGSGVLEGVKADKSKVKLTISDHLSKTTFFEFKEDGKTLVSRNV NSKDKSSTKEKFNKGESEKTLVRANGTKLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFLEGLTANEKATLVYKEGTVTLTKNIDKSGEITVALNDTDTSTAAATKKTGAWDSKSTLTIITVNS KTKDLVFTKQDTITVQKYDSAGTNLEGGTAVEIKLDELKNALK
B. bavariensis (Q6LBF1)	MKYYLLGIGLILALIAACKQNVSSLDEKNSVSVLPGEMKVLVSKEDKDGKYSLMATVDKLELEKGTSDKNSGSGTLEGEKSDKSKAKLTISEDLSKTTFFEFKEDGKTLVSKKVN SKDKSSEIEKFNKGESEKTLVRANGTRLEYTEIKSDGTGKAKEVLKDFALEGLTAAADKTTLVKTEGTVLTKNIPNSGEITVELNDSNSTQATKKTGWDSNTSTLTIISVNSKK TKNIVFTKEDTITVQKYDSAGTNLEGNVAEIKLDELKNALK

**Sequenzen V: OspC.**

B. burgdorferi s.s. (Q07337)	MKKNLTSAILMTLFLFISCNNSGKDGNTSANSADSVKGNPLTEISKKITDSNAVLLAVKEVEALLSSIDEIAAKAIGKIHQNNGLDTENNHNGLLAGAYAIKQKLDGLKN EGLKEKIDAAKCCSETFTNKLKEKHTDLGKEGVTDADAKAILEKNTNGTKGAEEELGKLFESVEVLSKAAKEMLANSVKELTS <b>PVVAESP</b> PKKP
B. garinii (B8F168)	MKKNLTSAILMTLFLFISCNNSGGDSASTNPDESEKGNPLTVISKKITDSNAFVAVKVEVEALLSSIDELAKGIGQKIDANGLNVAEADKNTSLLAGAYSISTLITKKLDELKINSGE LKGEVENAKNCSDAFTNKLKDVRAQLGVQNGGATNDHAKAAILKSNPTKDKGVDELEKLFKSVESLSKAAKEALSNSVKELTS <b>PVVAEAP</b> PKKP
B. afzelii (Q49576)	MKKNLTSAILMTLFLFISCNNSGKGGDSASTNPDESAGPNLTEISKKITDSNAFVAVKEVETLVSSIDELATAKIGQKIQNNGLAEEADKNSGSLLAGAYAIKQKLDGLKG LEGLNKEIAEAKCSEAFTKLQDSNADLGKHNATDADSKAILEKNTNGTKGAKEELELFKSVESLSKAAKEALSNSVKELTS <b>PVVAESP</b> PKKP
B. spielmanii (C0RBX1)	MKKNLTSAILMTLFLFISCNNSGGDSSTKPVDESAGPNLTEISKKITDSNTFVLAKEVETLVSSIDELAKAIGKIKIENNGLGTASHNTSLLAGAYTISSLITQKLNALKNSGEL KAEIEKAKNCSEAFTKLKEKHQDLGTAGGNATDDHAKAAILKTNATDDKGAKELELFESVESLSKAAKAAALANSVKELTS <b>PVVAETP</b> PKKP
B. bavariensis (A0A716GV44)	MKKNLTSAILMTLFLFISCNNSGGDSASTNPDESAGPNLTVISKKITDSNAFLAVKEVEALLSSIDELSKAIGKIKINDGTLNNEANRNESLIAGAYEISKLITQKLSVLNSEELEK EKIKEAKDCSEFTTKLKDASHAEILQISVQDDNAKKAILEKTHGTDKGAKELEELFKSVESLSKAAQAALNSVKELTN <b>PVVAETP</b> PKKP

Der hervorgehobene Sequenzabschnitt kennzeichnet eine konservierte immundominante Region (C10-Peptid).

## Sequenzen VI: p41.

B. burgdorferi s.s. (P11089)	MIINHNTSAINASRRNNGINAANLSKTQEKLSGGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIRGLSQASRNTSKAINFIQITTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIE QLTDEINRIADQAAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTP ASLSGSAQSWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGAQTAQAAPVQEGVQEGAGQQPAP ATAPSGGGVNSPVNVTTTVDANTSLAKIENAIRMISDQRANLGAFAQNRLESIKDSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVAAATTSILTQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR
B. garinii (Q57436)	MIINHNTSAINASRRNNGINAANLSKTQEKLSGGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIRGLSQASRNTSKAINFIQITTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIE QLTDEINRIADQAAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTP ASLSGSAQSWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGAAQTAPVQEGAGQQPAP VTAPSQGGVNSPVNVTTTVDANTSLAKIENAIRMISDQRANLGAFAQNRLESIKDSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVAAATTSILTQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR
B. afzelii (Q0SP16)	MIINHNTSAINASRRNNGINAANLSKTQEKLSGGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIRGLSQASRNTSKAINFIQITTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIE QLTDEINRIADQAAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTP ASLSGSAQSWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGAAQAAPVQEGAGQQPAP TAPTQGGVNSPVNVTTTVDANTSLAKIENAIRMISDQRANLGAFAQNRLESIKNSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVAAATTSILTQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR
B. spielmanii (C0AQ98)	MIINHNTSAINASRRNNGINAANLSKTQEKLSGGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIRGLSQASRNTSKAINFIQITTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIE QLTDEINRIADQAAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTP ASLSGAQTSWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGAAQAQTAPVQEGAGQQPAP TAPSQGGVNSPVNVTTTVDANTSLAKIENAIRMISDQRANLGAFAQNRLESIKDSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVAAATTSILTQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR
B. bavariensis (A0A716GVN5)	MIINHNTSAINASRRNNSINAANLSKTQEKLSGGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIRGLSQASRNTSKAINFIQITTEGNLNEVEKVLVRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIEIE QLTDEINRIADQAAQYNQMHMLSNKSASQNVRTAEELGMQPAKINTP ASLSGSAQSWTLRVHVGANQDEAIAVNIYAANVANLFSGEGSQAQTAPVQEGAGQQPAP ATAPSGGGVNSPVNVTTTVDANTSLAKIENAIRMISDQRANLGAFAQNRLESIKDSTEYAIENLKASYAQIKDATMTDEVAASTTSILTQSAMAMIAQANQVPQYVLSLLR

**Sequenzen VII: p83/100.**

B. burgdorferi s.s. (Q4TZW0)	MKKMLLIFSFFLISLNGFFPLNAREVDKEKLDKDFVNMDFVNYKGPYDSTNTYEQIVGIGEFARPLINSNSNSYYGKYFIDRFIDDDQDKKASVDVFSIGSKSQLDLSILNLRRLIT GYLIKSFYERSSAELIAKAITIHNAYRGDLNYYKEFYIESALKSLTKENAGLSRVYQWAGKTQIFIPKKNILSGKIESDIDIDSLVTDKVVAAALLSENEAGVNFARDITDIQGET HKADQDKIDIELDNVHESDSNITETIENLRDQLEKATDEEHKKEIESQVDAKKKQKEELDKAIDLDAQKQLDSSSEDNLDIQRDTVREKIQEDINEINKEKNLKPFGDVSSPKVD KQLQIKESLEDLQEQLEASDENQKREIEKQIEKKSDEELLKSDPKALDNRDSSKASSKEKIVKEESKVSGLDNLNENLMTPEYQKLSSEDKKLDSSKKNLKPVS EIERVNEISRSNNNEVSKSSALDKPYSYDIDSKEVVDNKDVNLQETKPKQTKSQPTSLNQDLTMSIDSSNPVFLVDPITNLGLTLQIDLINTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKD LVVVKMDSGKAKLQILNKLNLK/ISESNFEINKNSLLYVDSKMLVAVKDSGNVWRLAKFSPKNLDEFILSENKILPFTSFVRKNFIYLQDEFKSLITLDLNTLTKKVE
B. garinii (Q06B17)	MKKMLLIFSFFLISLNGFFPLNAREVDKEKLDKDFVNMDFVNYKGPYDSTNTYEQIVGIGEFARPLINSNSNSYYGKYFIDRFIDDDQDKKASVDVFSIGSKSQLDLSILNLRRLIT GYLIKSFYERSSAELIAKAITIHNAYRGDLNYYKEFYIESALKSLTKENAGLSRVYQWAGKTQIFIPKKNILSGKIESDIDIDSLVTDKVVAAALLSENEAGVNFARDITDIQGET HKADQDKIDIELDNVHESDSNITETIENLRDQLEKATDEEHKKEIESQVDAKKKQKEELDKAIDLDAQKQLDSEEDNLDIQRDTVREKIQEDINEINKEKNLPEPGDVSSPKVD KQLQIKESLEDLQEQLEASDENQKREIEKQIEKKSDEELLKSDPKALDNRDSSKASSKEKIVKEESKVSGLDNLNENLMTPEYQKLSSEDKKLDSSKKNLKPVS EIERVNEISRSNNNEVSKSSALDKPYSYDIDSKEVVDNKDVNLQETKPKQTKSQPTSLNQDLTMSIDSSNPVFLVDPITNLGLTLQIDLINTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKD LVVVKMDSGKAKLQILNKLNLK/ISESNFEINKNSLLYVDSKMLVAVKDSGNVWRLAKFSPKNLDEFILSENKILPFTSFVRKNFIYLQDEFKSLITLDLNTLTKKVE
B. afzelii (A0A250X2C1)	MKKMLLIFSFFLISLNGFFPLNAREVDKEKLDKDFVNMDFVNYKGPYDSTNTYEQIVGIGEFARPLINSNSNSYYGKYFVNRFDIDDDQDKKASVDVFSIGSKSELDLSILNLRRLIT GYLMKSFYERSSAELIAKAITIYNAYVYRGDLNYYKEFYIEASLSLTKENAGLSRVYQWAGKTQIFIPKKNILSGNVEDSIDIDSLVTDKVVAAALLSENEAGVNFARDITDIQGET ETHKADQDKIDIELDNVHESDSNITETIENLRDQLEKATDEEHKKEIESQVDAKKKQKEELDKAIDLDAQKQLDFAEDNLDIQRDTVREKIQEDINEINKEKNLKPFGDVSSP KVDKQLQIKESLEDLQEQLEASDENQKREIEKQIEKKNDEELLNKDHKALDLKQELNSKASSKEKIEGEEEDKELDSKKNLEPVSADKVDKISKSNNNEVSKLSPDDEPSY SDIDSKEGVDNKDVLQKTKPQVKSQPTSLNEDLTDVSDSSNPVFLVDPITNLGLTLQIDLINTGVRLKESAGQGIQRYGIYEREKDLVVIKIDSGKAKLQILNKLK/ISES NFEINKNSLLYVDSKMLVAVKDDSNAWRLAKFSPKNLDEFILSENKILPFTSFVAVRKNFIYLQDELKSLVTLDVNTLTKKVK
B. spielmanii (B9X822)	MKKMLLIFSFFLISLNGFFPLNAREVDKEKLDKDFVNMDFVNYKGPYDSTNTYEQIVGIGEFARQLTNSNSNSYYGKYFINRFDIDDDQDKKASVDVFSIGSKSELDLSILNLRRLIT GYLMKSFYDRSSAELIAKAITIYSAVYVYRGDLNYYKGYIDPALKSLTKENAGLSRVYQWAGKTQIFIPKKNILSGNVEDSIDIDSLVTDKVVAAALLSENEAGVNFARDITDIQGET ETHKADQDKIDIELDNVHESDSNITETIENLRDQLEKATDEEHKKEIESQVDAKKKQKEELDKAIDLDAQKQLDFAEDNLDIQRDTVREKIQEDINEINKEKNLKPFGDVSSP KVDKQLQIKESLEDLQEQLEASDENQKREIEKQIEKKSDEELLNKDHKALDLKQELNSKASSKEKIEGEEEDKELDSKKNLEPVSADKVDKISKSNNNEVSKLSPDDEPSY DDDSSYSDIDSKEGIDNKDVLNQQTKPQVKSQPTSLNEDLTDVSDSSNPVFLVDPITNLGLTLQIDLINTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKDLVVIKIDSGKAKLQILNKLK/ISES NFEINKNSLLYVDPVPRMILVVVRDESNWRLAKFSPENLDEFILSEDKILPFTSFVAVRKNFIYLQDELKSLITLDVNTLTKRKY
B. bavariensis (A0A250X2D5)	MKKMLLIFSFFLISLNGFFPLNAREVDKEKLDKDFVNMDFVNYKGPYDSTNTYEQIVGIGEFARPLINSNSNSYYGKYFIDRFIDDDQDKKASVDVFSIGSKSQLDLSILNLRRLIT GYLIKSFYERSSAELIAKAITIHNAYRGDLNYYKEFYIESALKSLTKENAGLSRVYQWAGKTQIFIPKKNILSGKIESDIDIDSLVTDKVVAAALLSENEAGVNFARDITDIQGET HKADQDKIDIELDNVHESDSNITETIENLRDQLEKATDEEHKKEIESQVDAKKKQKEELDKAIDLDAQKQLDSEEDNLDIQRDTVREKIQEDINEINKEKNLPEPGDVSSPKVD KQLQIKESLEDLQEQLEASDENQKREIEKQIEKKSDEELLKSDPKALDNRDSSKASSKEKIVKEESKVSGLDNLNENLMTPEYQKLSSEDKKLDSSKKNLKPVS EIERVNEISRSNNNEVSKSSALDKPYSYDIDSKEVVDNKDVNLQETKPKQTKSQPTSLNQDLTMSIDSSNPVFLVDPITNLGLTLQIDLINTGVRLKESTQQGIQRYGIYEREKD LVVVKMDSGKAKLQILNKLNLK/ISESNFEINKNSLLYVDSKMLVAVKDSGNVWRLAKFSPKNLDEFILSENKILPFTSFVRKNFIYLQDEFKSLITLDLNTLTKKVE

## Sequenzen VIII: VisE.

B. burgdorferi s.s. (G5IX16)	MMMKISSAILLTTFFVFINCKSQVADKDDPTNKFYQSVIQLGNGFLDVTFSFGLVAEAFGFKSDPKSDVKTFTTVAAKLEKTKTDLNSLPKEKSDISSTTGKPDSTGSGVT AVEGAIKEVSELLDKLVKAVKTAEGASSGTAIGEVDADAADVADKASVKGIAKGIKEIVEAAGGSEKLVAAAAGENNKGAGKLFGKAGAAAAGHDSEAAASKAAGAVSAV SGEQLSAIVTAADAAEQDGKKPEEAKNPIAAAIGDKDGGAEFGQDE <b>MKKDDQIAAAIALRGMAKDGGKFAV</b> KDGEKEKAEGAIGAAESAVRKVLGAITGLIGDAVSSGLRKY GDSVKAASKETPPALNK
B. garinii (B8F102)	MKKISSAIFTIVFFVFINCKSDTRKAINSIQTPKFTSFDGLIDGFPNPNPKKSEVKNYFNMAKTLNKAIDKFAKLISEESVKTTTEGKNTNTAKKDNSTVNPVDNEISKINDMIGK MINAANTIVETVAETATEAMGEVVEYKSSGNVETKADVKSVEIAKGIKKIVEAAGIADDELKAEGDKATKSSIDSNKKEAGKMFSGKQGDQGGKYVYSGVISPFIKGGANPMDIN KAAEAVKNVSGEQILGAIVAAAKAIESSGGKATIEGKNANEAKNPIEAAIIGNDSDSNATAFTGN <b>MEKDTQIAAAIVLRAMAKNGKFAV</b> KMGREPSGGDRAIRALVYKNAANKTVYD ALSKLVKLTINESLTIAKTI
B. afzeli (Q5DVM0)	MKKISSAIFLTLVFINCKNNAVKGNDKDSVKTFYESIINLNGFIDVFNAFSGLVADTFFKSDPKKSDVKTYFESISSTLKATKGLDELVSARKGEGGSSVKASVESAVDEV SKWLEEMIKAAEEAAKVGTTGGDGKIGDSSAANHGAKADKDSVKGIAKGIKIVDAAGKALGEKALKDVKAAADDEANADAGKLFAGNANAADVAAAADIAKAAGAVTAVSGE QILKAIVEAAGDPANQAGKKAEEAKNPIAAAIGTDDNGAAFKDE <b>MKSDKIAAAIVLRGVAKDGGKFAVK</b>
B. spielmanii (C3KF32)	KISSAIFIAAILFANCKNNAGEAAKEDPKSKFYDSIIKLNGLDVTFSFGLIADALGYKADPKKSEVKTYFDSLAKQLEKTKTDLNSLPKANNADSGTTAAKGEAAASAIVESAI KEYSVWLGEMAKAAAEAGKAATGGAADA VGVKIVSGNTAAKGGEEKSVNGIAKGIKIVDAAEKAGEKLAEGAGGGGNNAAAGKLFKKNNDGGDAEAAAGKAAAAVS AVSGEQIIKAIVDAAAAGGEKAAVADDVKKAKDPITAAIGSTGEQNAAAAFDEAA <b>MKKDAQIAAAIVLRGMKDGKFAV</b> KKPNSSSTLAAVTSGSELGTKLDH
B. bavariensis (Q5DVM3)	MKKISSAIFIVAFALIGCKNNVGGDDKDTAASIFYQSIINLNGGFIEVFNAFSGLVADAFSKADPKKSDVKTYFDSITKTLKDTKTKLEDISKEKTGGEKTPAVEGIAEVVKTVGE WLDGLIKAAEAGGGKAAADGGSDKIGNVAAAGGAGADKESVNGIAGIAGIVEAARKVGVKFAKPAKAAAADAAAADGNKKAGKLFGTAAGADAGDYKDAAAAAGVAVSGEQILN AIVTAAGQAGQAGKKAADEAKNAIEAAIGAAGDADFDDDI <b>KKNDQIAAALVLRGVAKDGGKFAV</b>

Der hervorgehobene Sequenzabschnitt kennzeichnet eine konservierte immundominante Region (IR6, C6-Peptid).

## Tabellen

Assay-Präzision des *Borrelia multiplex***Tabelle 7-1: Cohen's Kappa Koeffizienten aus dem Vergleich des *Borrelia multiplex* mit kommerziellen Borreliose-Tests.**

Für den Vergleich des *Borrelia multiplex* mit dem kommerziellen Test „recomBead *Borrelia* IgG/IgM 2.0“ wurden 319 Proben aus der MEMO-Studie verwendet. Der Vergleich des *Borrelia multiplex* mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik erfolgte anhand von 662 Proben aus der MuSPAD-Studie. Bei beiden Vergleichen wurde der *Borrelia multiplex* sowohl manuell als auch automatisiert durchgeführt. Bei einem Wert > 0.8 liegt eine nahezu vollständige Übereinstimmung vor.

Klassifizierung	recomBead <i>Borrelia</i> IgG/IgM 2.0		2-Stufen-Diagnostik	
	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung	manuelle Durchführung	automatisierte Durchführung
<b>IgG/IgM</b>	0,875 (95%CI 0,809 - 0,941)	0,682 (95%CI 0,585 - 0,779)	0,601 (95%CI 0,499 - 0,704)	0,632 (95%CI 0,523 - 0,740)
<b>IgG</b>	0,938 (95%CI 0,888 - 0,987)	0,727 (95%CI 0,632 - 0,822)	0,862 (95%CI 0,781 - 0,942)	0,798 (95%CI 0,699 - 0,897)
<b>IgM</b>	0,504 (95%CI 0,249 - 0,758)	0,435 (95%CI 0,135 - 0,700)	0,185 (95%CI 0,041 - 0,330)	0,265 (95%CI 0,075 - 0,455)



## Messung von Serum-Proben der MuSPAD-Studie

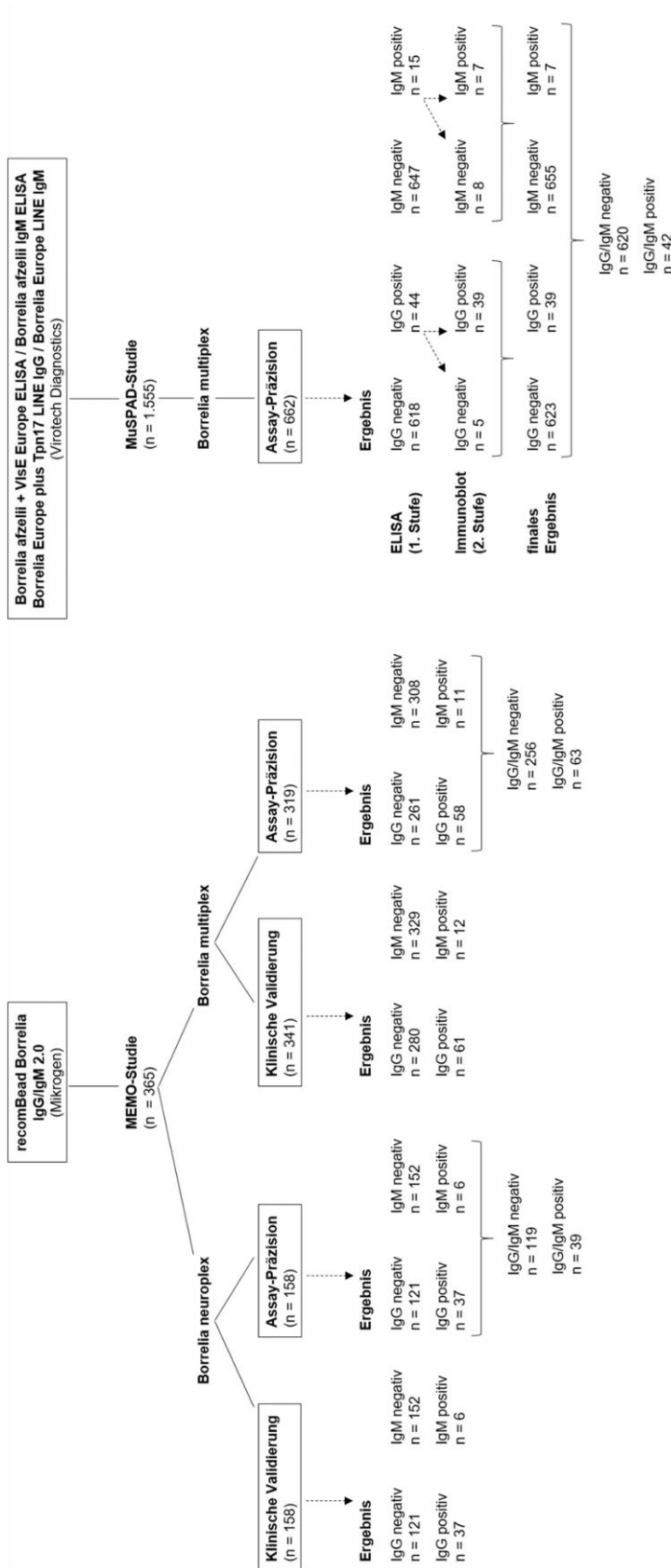
**Tabelle 7-2: Absolute Werte und Prozente aus der Analyse von Serum-Proben der MuSPAD-Studie.**

1.555 Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie wurden mit dem automatisierten Borrelia multiplex gemessen. Die statistische Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Bezug auf Standort, Geschlecht und Altersgruppe. Die Berechnung der Konfidenzintervalle erfolgte nach Wilson/Brown.

<b>Kategorie</b>		<b>Borreliose negativ n (%)</b>	<b>Borreliose positiv n (%)</b>
<b>Standort</b> n = 1.555	<b>Osnabrück</b> n = 175	151 (86,3 %) (95%CI 80,4 - 90,6 %)	24 (13,7 %) (95%CI 9,4 - 19,6 %)
	<b>Greifswald</b> n = 175	146 (83,4 %) (95%CI 77,2 - 88,2 %)	29 (16,6 %) (95%CI 11,8 - 22,8 %)
	<b>Chemnitz</b> n = 176	154 (87,5 %) (95%CI 81,8 - 91,6 %)	22 (12,5 %) (95%CI 8,4 - 18,2 %)
	<b>Magdeburg</b> n = 214	194 (90,7 %) (95%CI 86,0 - 93,9 %)	20 (9,3 %) (95%CI 6,1 - 14,0 %)
	<b>Aachen</b> n = 172	158 (91,9 %) (95%CI 86,8 - 95,1 %)	14 (8,1 %) (95%CI 4,9 - 13,2 %)
	<b>Reutlingen</b> n = 343	310 (90,4 %) (95%CI 86,8 - 93,1 %)	33 (9,6 %) (95%CI 6,9 - 13,2 %)
	<b>Freiburg</b> n = 300	264 (88,0 %) (95%CI 83,8 - 91,2 %)	36 (12,0 %) (95%CI 8,8 - 16,2 %)
<b>Geschlecht</b> n = 1.555	<b>Männer</b> n = 708	602 (85,0 %) (95%CI 82,2 - 87,5 %)	106 (15,0 %) (95%CI 12,5 - 17,8 %)
	<b>Frauen</b> n = 847	775 (91,5 %) (95%CI 89,4 - 93,2 %)	72 (8,5 %) (95%CI 6,8 - 10,6 %)
<b>Altersgruppe</b> n = 1.555	<b>18-25</b> n = 125	119 (95,2 %) (95%CI 90,0 - 97,8 %)	6 (4,8 %) (95%CI 2,2 - 10,1 %)
	<b>26-45</b> n = 450	403 (89,6 %) (95%CI 86,4 - 92,1 %)	47 (10,4 %) (95%CI 7,9 - 13,6 %)
	<b>46-65</b> n = 617	550 (89,1 %) (95%CI 86,4 - 91,4 %)	67 (10,9 %) (95%CI 8,6 - 13,6 %)
	<b>66-79</b> n = 297	253 (85,2 %) (95%CI 80,7 - 88,8 %)	44 (14,8 %) (95%CI 11,2 - 19,3 %)
	<b>&gt;79</b> n = 66	52 (78,8 %) (95%CI 67,5 - 86,9 %)	14 (21,2 %) (95%CI 13,1 - 32,5 %)

Abbildungen

Probenmessungen mit kommerziellen Borreliose-Tests

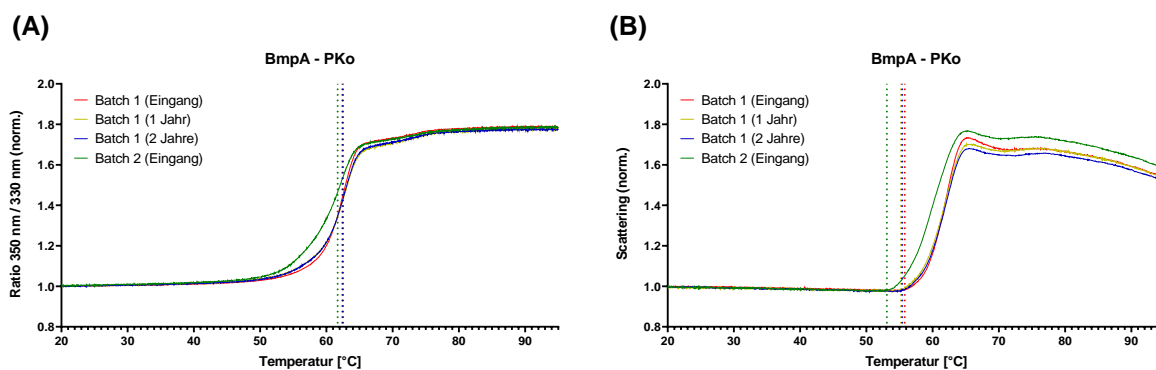


**Abbildung 7-1: Probenmessung mit kommerziellen Borreliose-Tests.**

Mit dem kommerziellen Borreliose-Test der Firma Mikrogen (recomBead Borrelia IgG/IgM 2.0) wurden insgesamt 365 Serum-Proben aus der MEMO-Studie analysiert. Jeweils ein Teil der Ergebnisse wurde für die klinische Validierung und die Bestimmung der Assay-Präzision des Borrelia multiplex sowie des Borrelia neuroplex verwendet. Mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik bestehend aus einem ELISA und einem Immunoblot der Firma Virotech Diagnostics wurden 1.555 Serum-Proben aus der MuSPAD-Studie analysiert. Ein Teil des Ergebnisses wurde für die Bestimmung der Assay-Präzision des Borrelia multiplex verwendet.

## Proteinanalysen der *Borrelia*-Antigene

Bei allen Antigenen wurde die thermische Stabilität (A) und das Aggregationsverhalten (B) untersucht. Die Analysen erfolgten in Einfachbestimmungen<sup>(E)</sup>, Duplikaten<sup>(D)</sup> oder Triplikaten<sup>(T)</sup>.

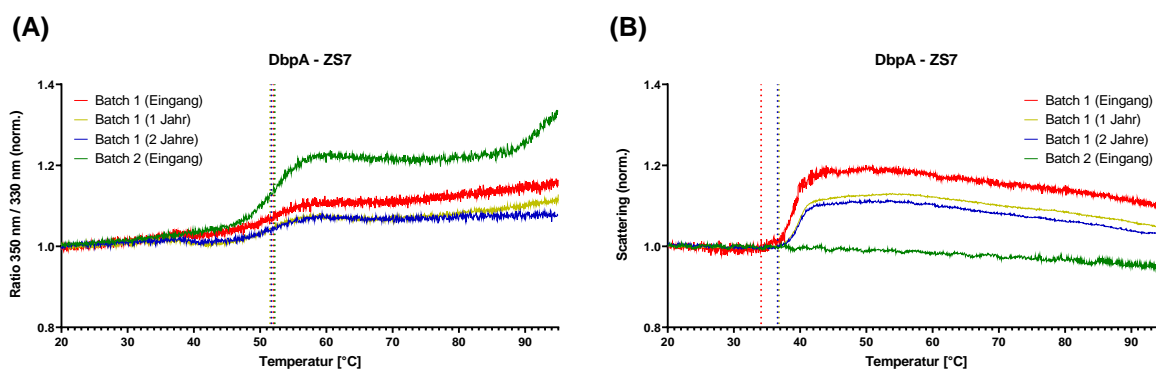


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
PBS pH 7,4	1,44 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	62,4 ± 0,04	-	55,8 ± 0,12
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	62,5 ± 0,04	-	55,2 ± 0,03
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	62,5 ± 0,07	-	55,4 ± 0,30
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	61,7 ± 0,00	-	53,1 ± 0,34

(-) nicht vorhanden

### Abbildung 7-2: Proteinanalysen des Antigens BmpA - PKo.

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 62,4 ± 0,04 °C und eine Tagg von 55,8 ± 0,12 °C. Bei Analysen nach einem Jahr (gelb) und zwei Jahren (blau) konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten festgestellt werden. Auch bei einer zweiten Batch hatte das Antigen eine vergleichbare Tm und Tagg.



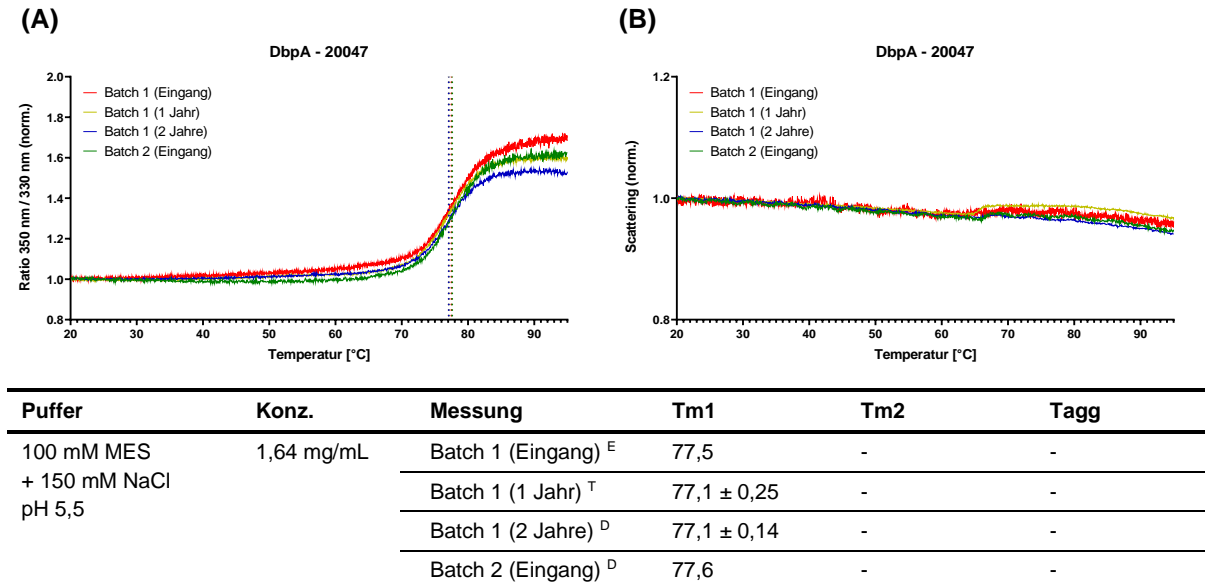
Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	0,69 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	52,0	-	34,1
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	51,5 ± 0,88	-	36,8 ± 0,15
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	51,7 ± 0,17	-	36,6 ± 0,36
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	52,2 ± 0,10	-	-

(-) nicht vorhanden

### Abbildung 7-3: Proteinanalysen des Antigens DbpA - ZS7.

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 62,0 °C und eine Tagg von 34,1 °C. Bei Analysen nach einem Jahr (gelb) und zwei Jahren (blau) konnte keine größere Veränderung in der thermischen Stabilität

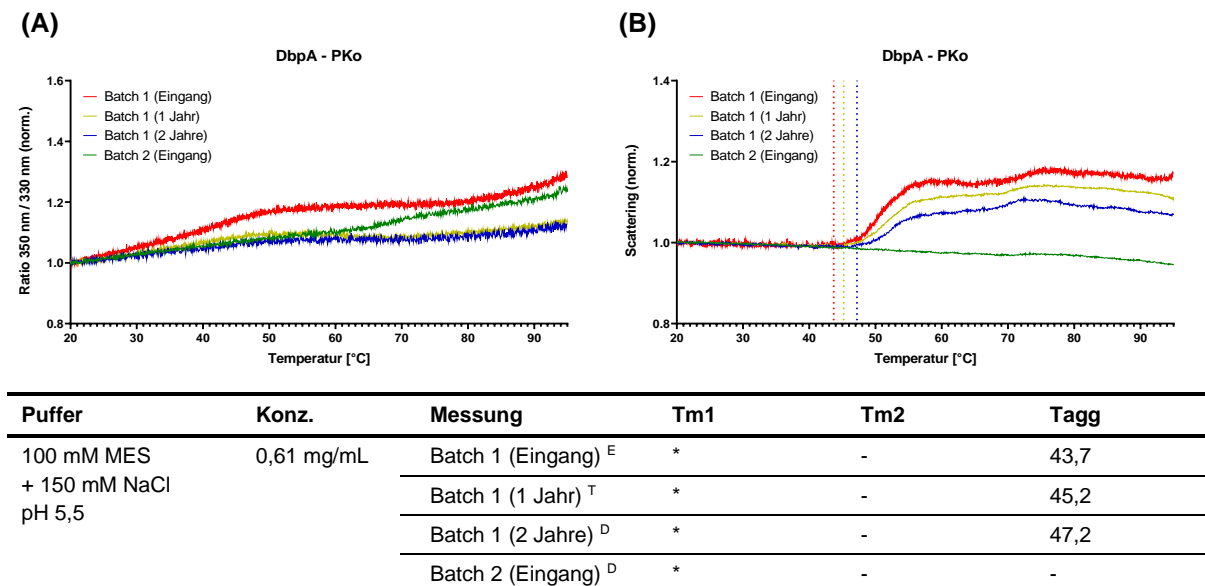
festgestellt werden. Die Tagg erhöhte sich um etwa 2 °C. Bei einer zweiten Batch (grün) gab es keine Aggregation. Die Schmelzkurve des Antigens unterschied sich etwas von den Kurven der ersten Batch. Die Tm war jedoch auch hier  $52,2 \pm 0,10$  °C.



(-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-4: Proteinanalysen des Antigens DbpA - 20047.**

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 77,5 °C. Eine Aggregation lag nicht vor. Bei Analysen nach einem Jahr (gelb) und zwei Jahren (blau) konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten festgestellt werden. Die Tm und Tagg einer zweiten Batch stimmten mit der Tm und Tagg der ersten Batch überein.

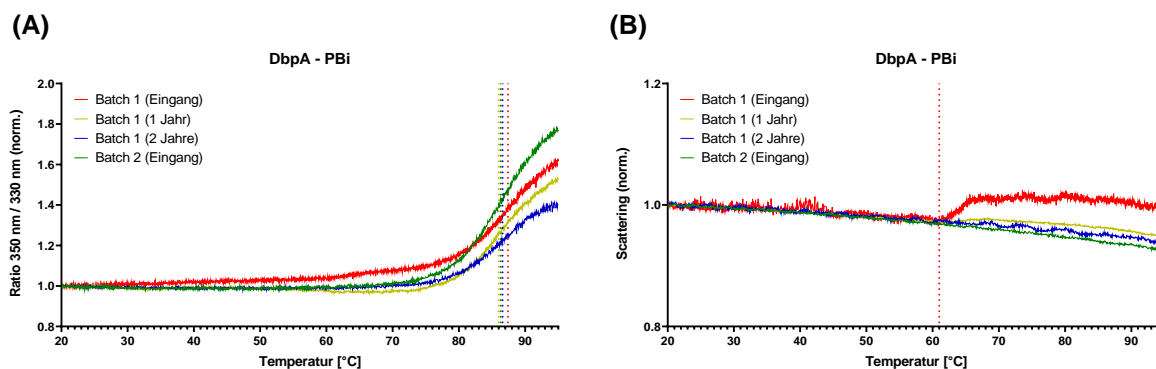


(\*) nicht berechenbar (-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-5: Proteinanalysen des Antigens DbpA - PKo.**

Bei diesem Antigen konnte die Software keine Schmelztemperaturen berechnen. Nach einem Jahr (gelb) war allerdings eine Veränderung der Schmelzkurve zu erkennen. Nach einem weiteren Jahr (blau) konnte keine weitere Veränderung beobachtet werden. Bei allen drei Analysen konnte eine Aggregation festgestellt werden. Die Tagg

erhöhte sich jedes Jahr um etwa 2 °C. Bei einer zweiten Batch lag keine Aggregation vor und auch die Schmelzkurve unterschied sich von den Kurven der ersten Batch.

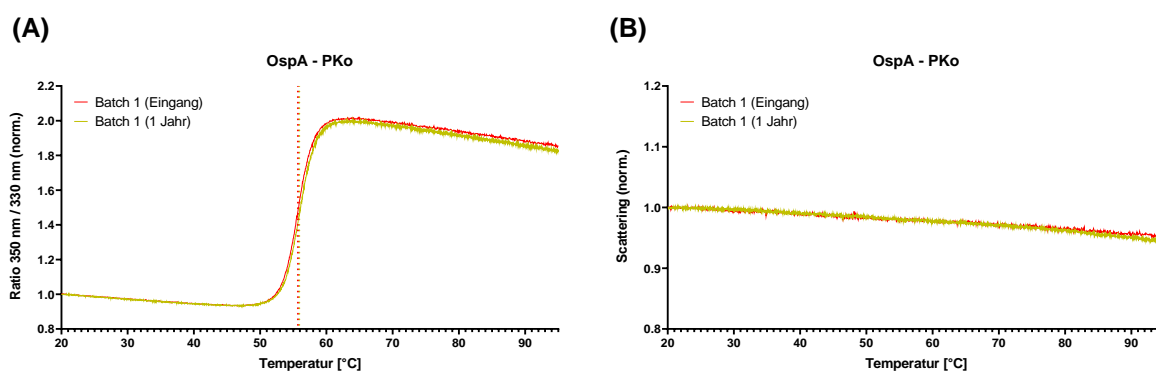


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	1,24 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	87,4	-	61,0
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	86,0 ± 0,6	-	-
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>E</sup>	86,6	-	-
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	86,3 ± 0,86	-	-

(-) nicht vorhanden

#### Abbildung 7-6: Proteinanalysen des Antigens DbpA - PBI.

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 87,4 °C und eine Tagg von 61,0 °C. Bei Analysen nach einem Jahr (gelb) und zwei Jahren (blau) konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität festgestellt werden. Im Vergleich zur ersten Analyse konnte keine Aggregation festgestellt werden. Es könnte sich daher bei der ersten Analyse um eine fälschlicherweise berechnete Tagg handeln. Bei einer erneuten Produktion des Antigens (Batch 2, grün) fand ebenfalls keine Aggregation statt und die ermittelte Tm entsprach der Tm der ersten Batch.

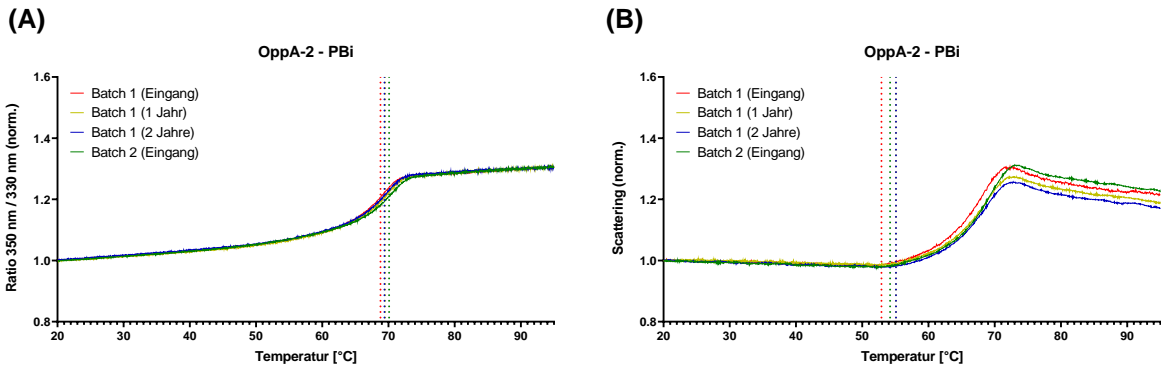


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
PBS pH 7,4	1,42 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	55,7 ± 0,03	-	-
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	55,9 ± 0,04	-	-

(-) nicht vorhanden

#### Abbildung 7-7: Proteinanalysen des Antigens OspA - PKo.

Das Antigen hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 55,7 ± 0,03 °C. Eine Aggregation lag nicht vor. Eine Analyse nach einem Jahr (gelb) ergab keine Veränderung in der thermischen Stabilität oder der Aggregation. Von diesem Antigen wurde keine zweite Batch produziert.

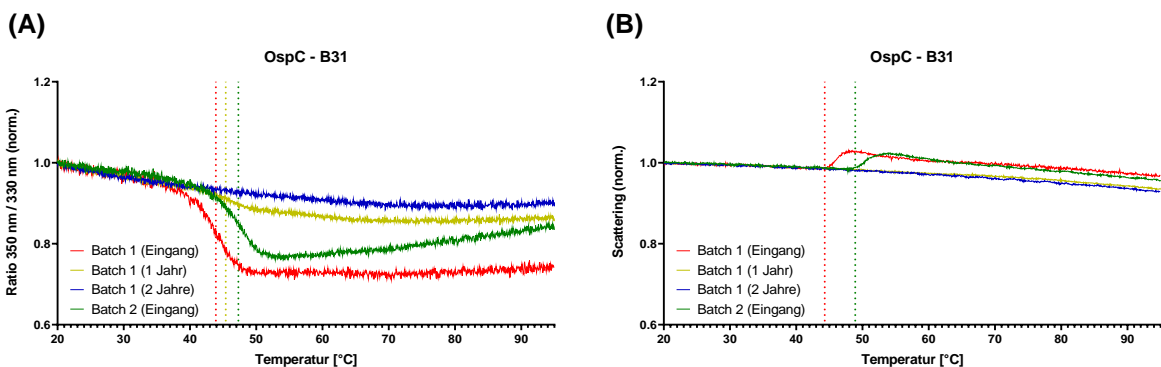


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
PBS pH 7,4	0,43 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	68,8 ± 0,02	-	52,9 ± 0,73
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	69,5 ± 0,05	-	55,1 ± 0,70
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	69,4 ± 0,03	-	55,1 ± 0,23
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	70,1 ± 0,03	-	54,2 ± 0,17

(-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-8: Proteinanalysen des Antigens OppA-2 - PBI.**

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 68,6 ± 0,02 °C und eine Tagg von 52,9 ± 0,73 °C. Sowohl nach einem Jahr (gelb) als auch nach zwei Jahren (blau) konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten festgestellt werden. Für die zweite Batch wurden eine vergleichbare Tm und Tagg ermittelt.

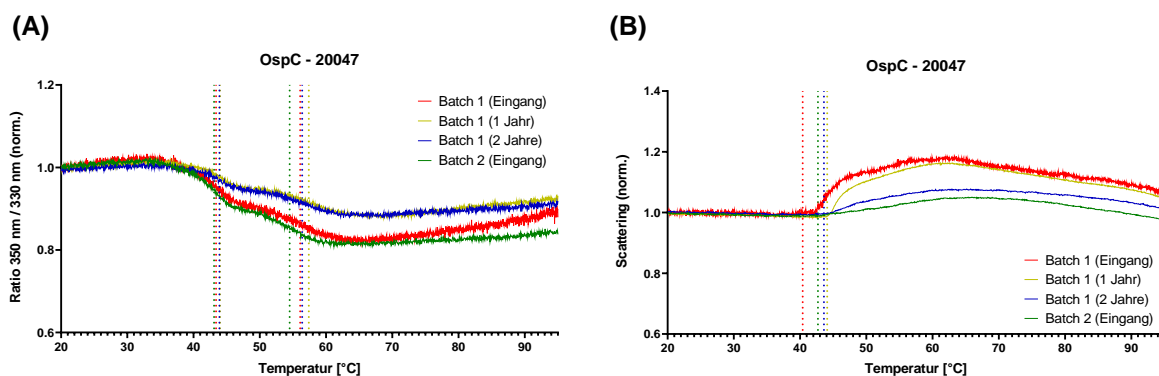


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	1,22 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	43,9 ± 0,06	-	44,3 ± 0,39
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	45,4 ± 0,02	-	-
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	*	-	-
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	47,3 ± 0,97	-	48,9 ± 0,17

(\*) nicht berechenbar (-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-9: Proteinanalysen des Antigens OspC - B31.**

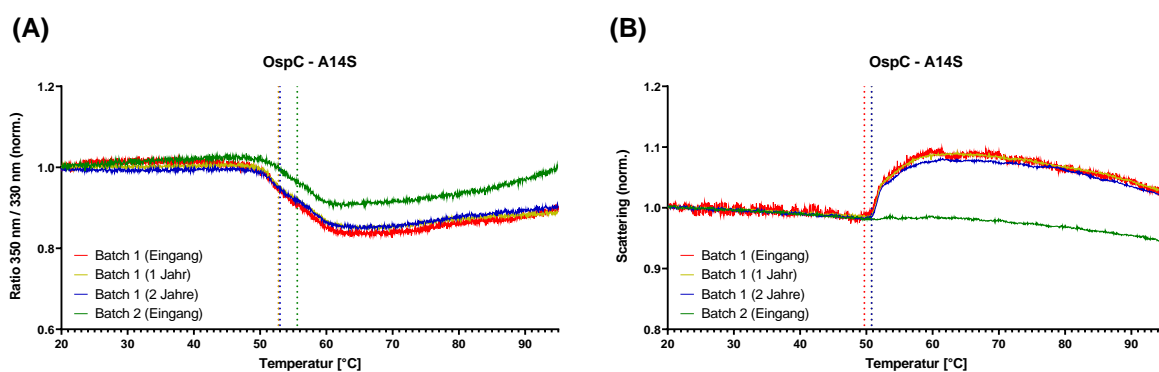
Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 43,9 ± 0,06 °C und eine Tagg von 44,3 ± 0,39 °C. Bei der Analyse nach einem Jahr (gelb) war die Tm um etwa 2 °C höher und auch die Schmelzkurve war deutlich verändert. Nach zwei Jahren (blau) konnte keine Tm mehr bestimmt werden. Auch das Aggregationsverhalten veränderte sich mit der Zeit. Nach einem Jahr konnte keine Aggregation mehr festgestellt werden. Auf Grund der veränderten Schmelzkurve und der nicht mehr messbaren Aggregation, war hier davon auszugehen, dass es bereits zu einer Denaturierung des Proteins gekommen war. Die zweite Batch (grün) hatte eine Tm von 47,3 ± 0,97 °C. Die Schmelzkurve ähnelte der Kurve von Batch 1. Auch bei der zweiten Batch konnte eine Aggregation festgestellt werden. Wie auch die Tm war die berechnete Tagg höher als bei der ersten Batch.



Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	2,04 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	43,4	56,1	40,4
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	44,0 ± 0,13	57,4 ± 0,38	44,1 ± 0,17
	2,1 mg/mL	Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	43,9 ± 0,10	56,4 ± 0,46	43,6 ± 0,25
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	43,1 ± 0,08	54,5 ± 0,11	42,7 ± 1,17

**Abbildung 7-10: Proteinanalysen des Antigens OspC - 20047.**

Bei diesem Antigen erfolgte die Denaturierung in zwei Stufen, so dass zwei Schmelztemperaturen ermittelt wurden. Bei der Eingangsanalyse der ersten Batch (rot) war die erste Schmelztemperatur (Tm1) 43,4 °C und die zweite Schmelztemperatur (Tm2) 56,1 °C. Die Aggregation begann bei 40,4 °C. Nach einem Jahr (gelb) konnte eine veränderte Schmelzkurve beobachtet werden. Die beiden Schmelztemperaturen blieben jedoch in etwa gleich. Zudem erhöhte sich die Aggregationstemperatur um etwa 4 °C. Nach einem weiteren Jahr (blau) gab es keine weitere Veränderung in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten auf. Die Schmelzkurve der zweiten Batch (grün) und auch die dazugehörigen Schmelztemperaturen stimmten mit der Eingangsanalyse der ersten Batch überein. Die Aggregation begann hier bei 42,7 ± 1,17 °C.

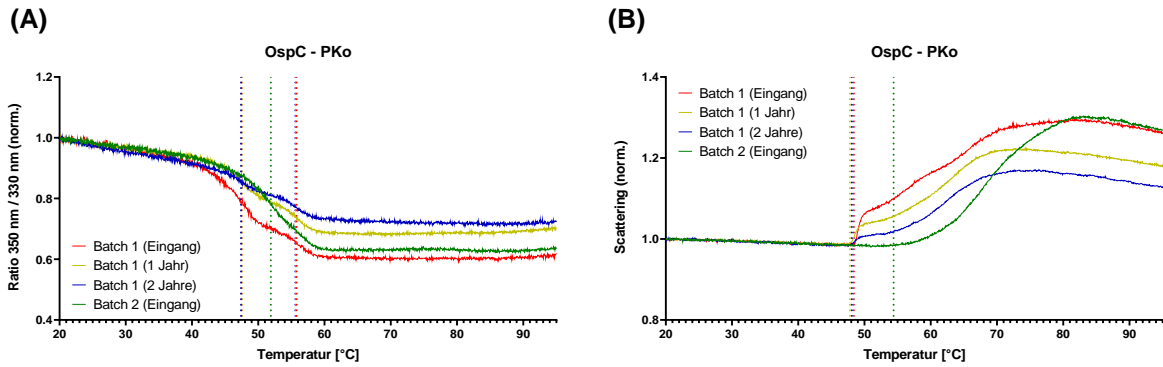


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	1,26 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	52,8	-	49,7
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	52,8 ± 0,04	-	50,8 ± 0,15
	-	Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	53,0 ± 0,13	-	50,8 ± 0,12
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	55,6 ± 0,11	-	-

(-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-11: Proteinanalysen des Antigens OspC - A14S.**

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 52,8 °C und eine Tagg von 49,7 °C. Bei Analysen nach einem Jahr (gelb) und zwei Jahren (blau) konnte keine Veränderung in der thermischen Stabilität oder dem Aggregationsverhalten festgestellt werden. Eine zweite Batch (grün) hatte eine leicht veränderte Schmelzkurve und es wurde eine Tm von 55,6 ± 0,11 °C berechnet. Eine Aggregation konnte nicht festgestellt werden.

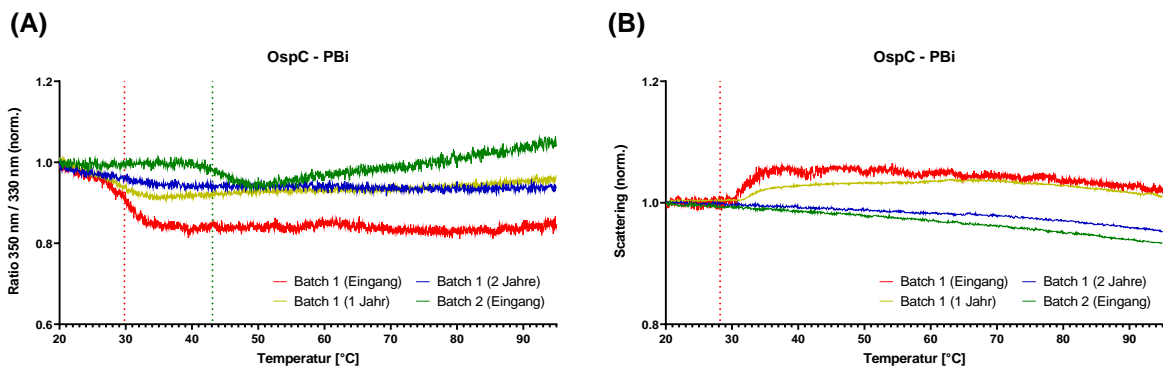


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	1,16 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	47,5 ± 0,20	55,8 ± 0,22	48,4 ± 0,06
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	47,5 ± 0,17	55,7 ± 0,02	47,8 ± 0,10
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>D</sup>	47,4 ± 0,02	55,6 ± 0,01	48,1 ± 0,13
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	51,9 ± 0,09	-	54,4 ± 1,17

(-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-12: Proteinanalysen des Antigens OspC - PKo.**

Es wurden zwei Schmelztemperaturen ermittelt. Bei der Eingangsanalyse der ersten Batch (rot) war die erste Schmelztemperatur (Tm1) 47,5 ± 0,20 °C und die zweite Schmelztemperatur (Tm2) 55,8 ± 0,22 °C. Die Aggregation begann bei 48,4 ± 0,06 °C. Nach einem Jahr (gelb) konnte eine Veränderung in der Schmelzkurve und der Aggregationskurve beobachtet werden. Die beiden Schmelztemperaturen sowie die Aggregationstemperatur blieben jedoch in etwa gleich. Nach einem weiteren Jahr (blau) konnte eine weitere leichte Veränderung festgestellt werden. Die Schmelztemperaturen und die Aggregationstemperatur blieben weiterhin unverändert. Bei einer zweiten Batch (grün) verliefen die Schmelzkurve und die Aggregationskurve ebenfalls etwas anders. Hier konnte nur noch eine Tm von 51,9 ± 0,09 °C ermittelt werden. Durch eine veränderte thermische Stabilität gegenüber der ersten Batch, kam es vermutlich zu einer überlappenden Denaturierung der unterschiedlich stabilen Antigen-Bereiche. Die Aggregation der zweiten Batch begann bei 54,4 ± 1,17 °C.



Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	0,21 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	29,8	-	28,2
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	*	-	*
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>T</sup>	*	-	-
		Batch 2 (Eingang) <sup>D</sup>	43,1 ± 0,97	-	-

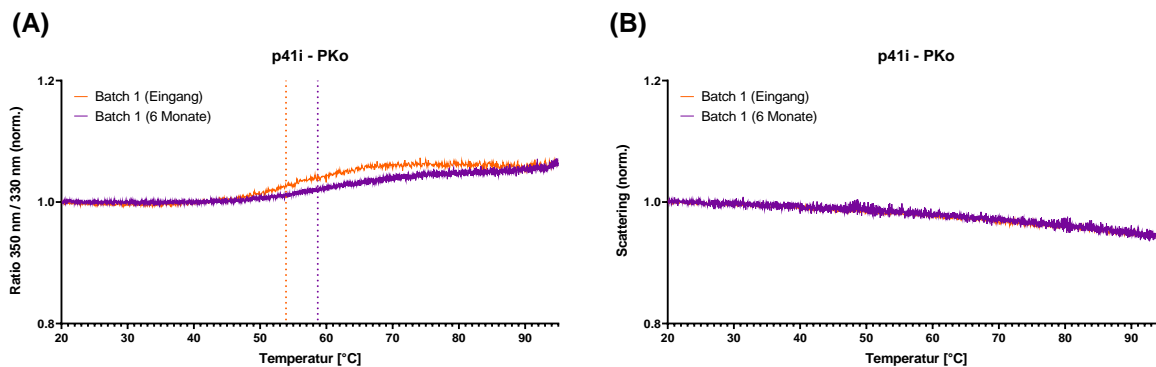
(\*) nicht berechenbar (-) nicht vorhanden

**Abbildung 7-13: Proteinanalysen des Antigens OspC - PBi.**

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (rot) eine Tm von 29,8 °C und eine Tagg von 28,2 °C. Nach einem Jahr (gelb) konnte keine Tm mehr berechnet werden und die Schmelzkurve hatte sich deutlich verändert. Auch



eine Tagg konnte nicht mehr berechnet werden. Die Aggregationskurve zeigte jedoch nur eine geringe Veränderung. Nach zwei (Jahren) konnte keine Aggregation mehr gemessen werden. Es war davon auszugehen, dass es bereits zu einer Denaturierung des Proteins gekommen war. Eine zweite Batch (grün) hatte erneut eine andere Schmelzkurve. Es wurde eine  $T_m$  von  $43,1 \pm 0,97$  °C ermittelt. Eine Aggregation lag nicht vor.

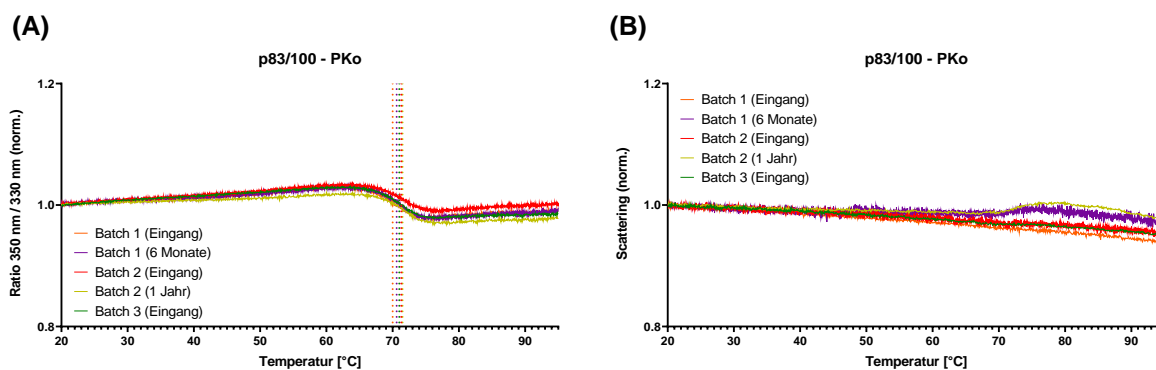


Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
PBS pH 7,4	0,60 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	53,9 ± 0,94	-	-
		Batch 1 (6 Monate) <sup>T</sup>	58,7 ± 1,64	-	-

(-) nicht vorhanden

#### Abbildung 7-14: Proteinanalysen des Antigens p41i - PKo

Das Antigen hatte bei der Eingangsanalyse (orange) eine  $T_m$  von  $53,9 \pm 0,94$  °C. Eine Aggregation lag nicht vor. Bei einer Analyse nach 6 Monaten (lila) zeigte sich eine Veränderung in der thermischen Stabilität. Die  $T_m$  stieg um etwa 5 °C auf  $58,7 \pm 1,64$  °C. Eine Aggregation konnte nach wie vor nicht beobachtet werden. Das Antigen wurde nicht weiterverwendet und es wurde keine zweite Batch produziert.



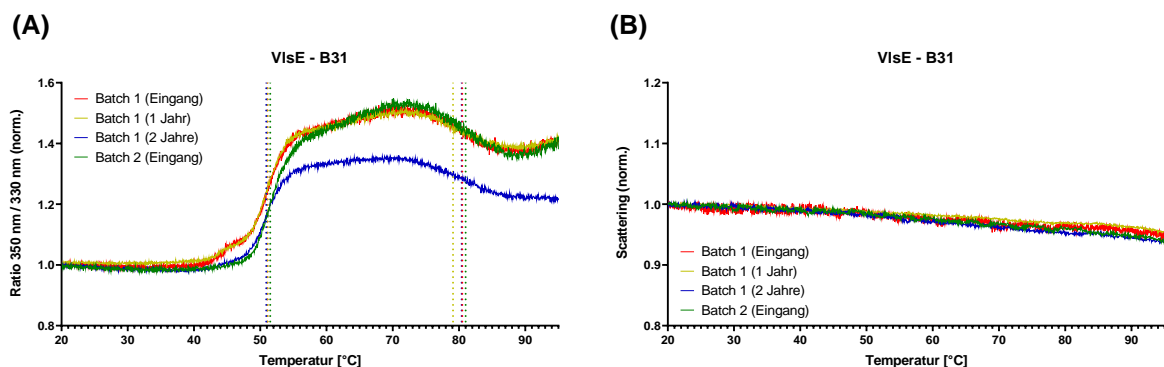
Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
PBS pH 7,4	0,73 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>T</sup>	70,0 ± 0,05	-	-
		Batch 1 (6 Monate) <sup>T</sup>	70,6 ± 0,03	-	*
PBS + 0,5 % Trehalose pH 7,4	1,10 mg/mL	Batch 2 (Eingang) <sup>T</sup>	71,3 ± 0,08	-	-
		Batch 2 (1 Jahr) <sup>D</sup>	71,5 ± 0,02	-	*
	0,82 mg/mL	Batch 3 (Eingang) <sup>D</sup>	71,0 ± 0,01	-	-

(\*) nicht berechenbar (-) nicht vorhanden

#### Abbildung 7-15: Proteinanalysen des Antigens p83/100 - PKo.

Die erste Batch hatte bei der Eingangsanalyse (orange) eine  $T_m$  von  $70,0 \pm 0,05$  °C. Es konnte keine Aggregation festgestellt werden. Nach sechs Monaten (lila) war keine Veränderung der thermischen Stabilität zu beobachten. Es zeigte sich allerdings eine zuvor nicht dagewesene Aggregation. Bei einer zweiten Batch (rot) mit anderem Lagerungspuffer konnte die gleiche Schmelztemperatur berechnet werden wie bei der Eingangsanalyse der ersten

Batch. Auch hier lag keine Aggregation vor. Eine Veränderung der thermischen Stabilität konnte nach einem Jahr (gelb) nicht festgestellt werden. Es fand jedoch wieder eine Aggregation statt. Eine dritte Batch (grün) bestätigte die stabile Produktion des Antigens.



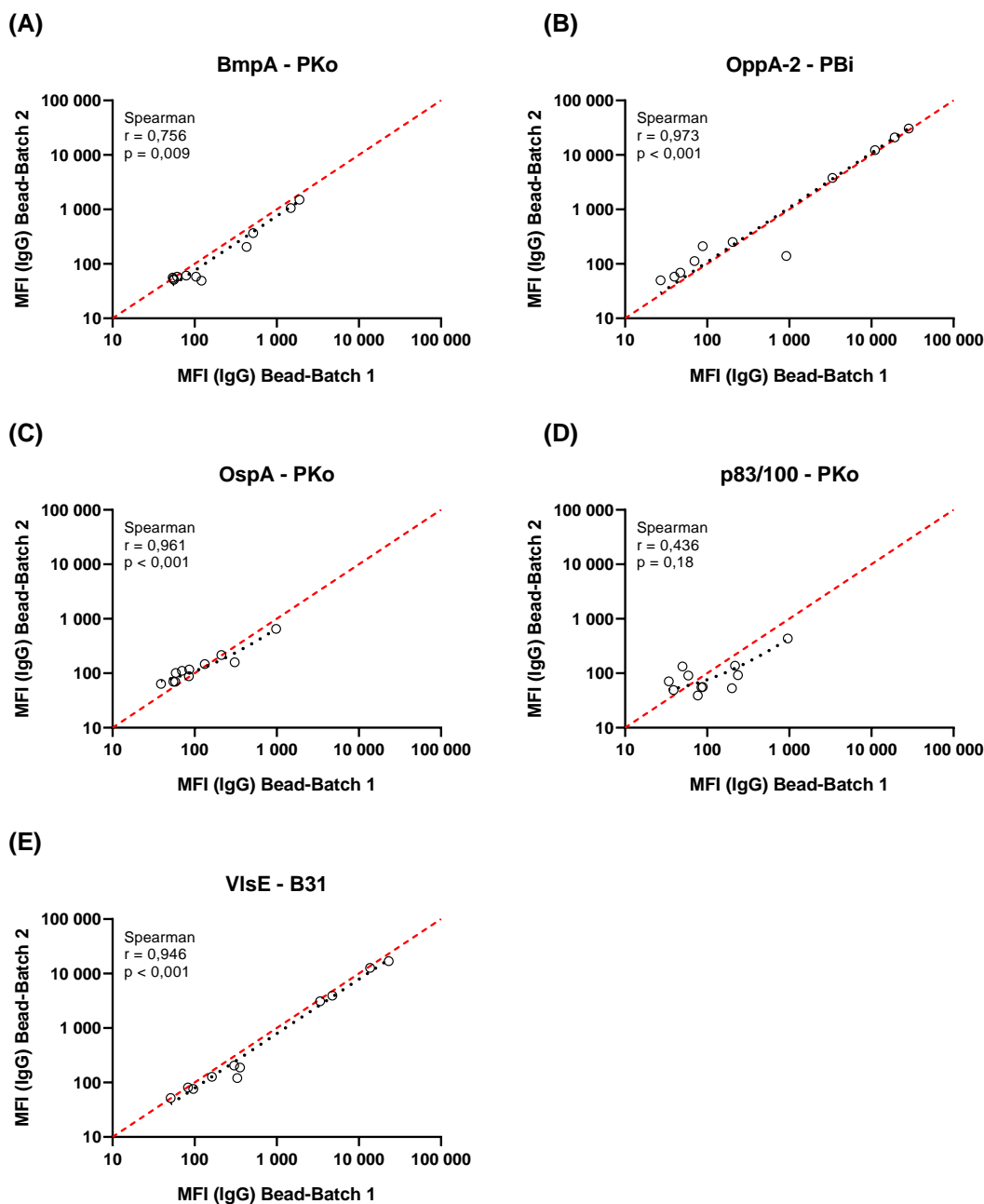
Puffer	Konz.	Messung	Tm1	Tm2	Tagg
100 mM MES + 150 mM NaCl pH 5,5	0,95 mg/mL	Batch 1 (Eingang) <sup>E</sup>	51,1	80,5	-
		Batch 1 (1 Jahr) <sup>T</sup>	51,1 ± 0,04	79,1 ± 0,17	-
		Batch 1 (2 Jahre) <sup>E</sup>	50,9	80,4	-
		Batch 2 (Eingang) <sup>E</sup>	51,5	81,0	-

(-) nicht vorhanden

#### Abbildung 7-16: Proteinanalysen des Antigens VisE - B31.

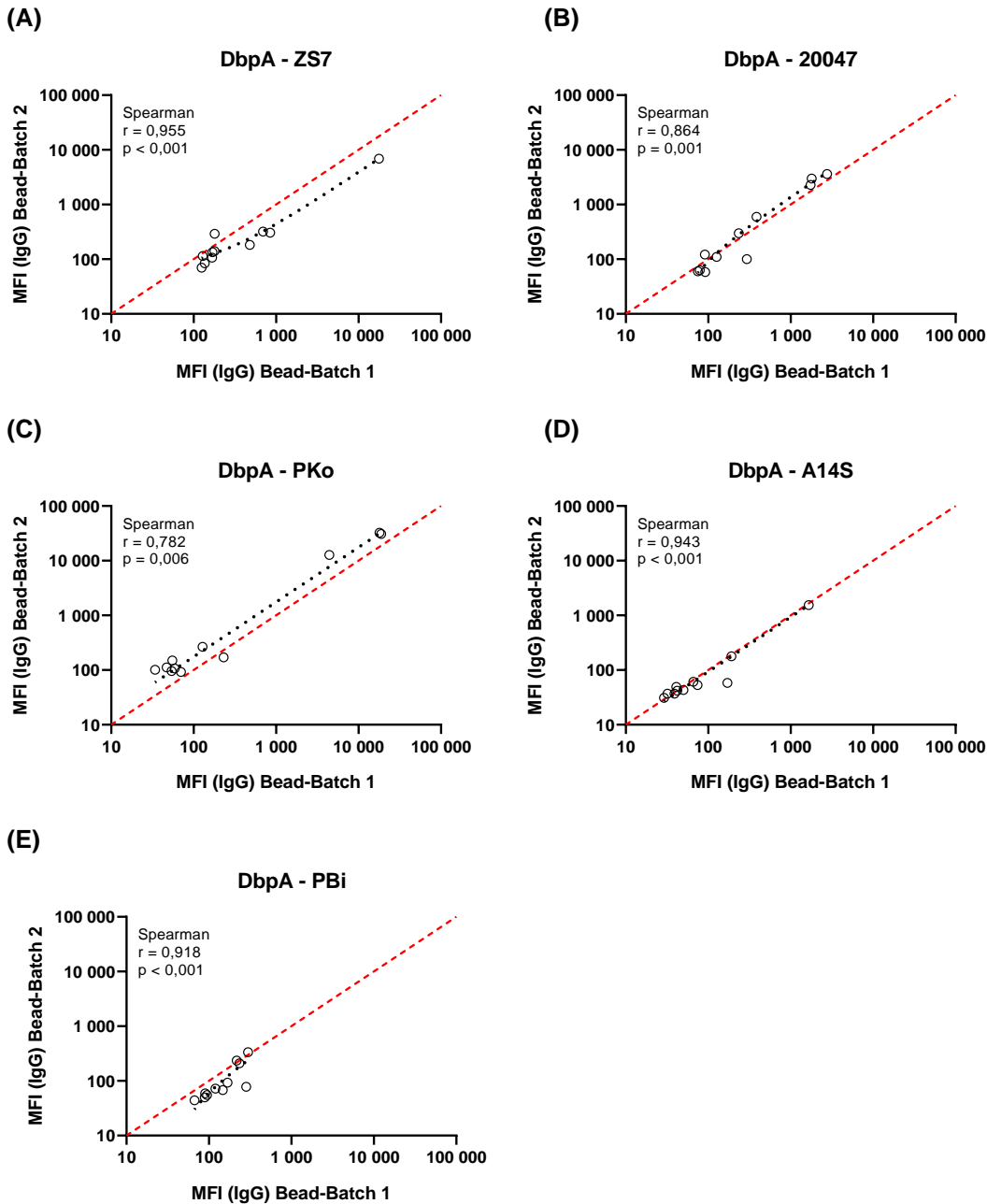
Bei diesem Antigen erfolgte die Denaturierung in zwei Stufen, so dass zwei Schmelztemperaturen ermittelt wurden. Bei der Eingangsanalyse der ersten Batch (rot) war die erste Schmelztemperatur (Tm1) 51,1 °C und die zweite Schmelztemperatur (Tm2) 80,5 °C. Eine Aggregation lag nicht vor. Nach einem Jahr (gelb) konnte noch keine Veränderung in der thermischen Stabilität festgestellt werden. Nach zwei Jahren (blau) allerdings stimmte die Schmelzkurve nicht mehr mit den vorherigen Kurven überein. Die Schmelztemperatur änderte sich jedoch nicht. Die Analyse einer zweiten Batch stimmte mit der Eingangsanalyse der ersten Batch überein.

## Reproduzierbarkeit der Immobilisierung



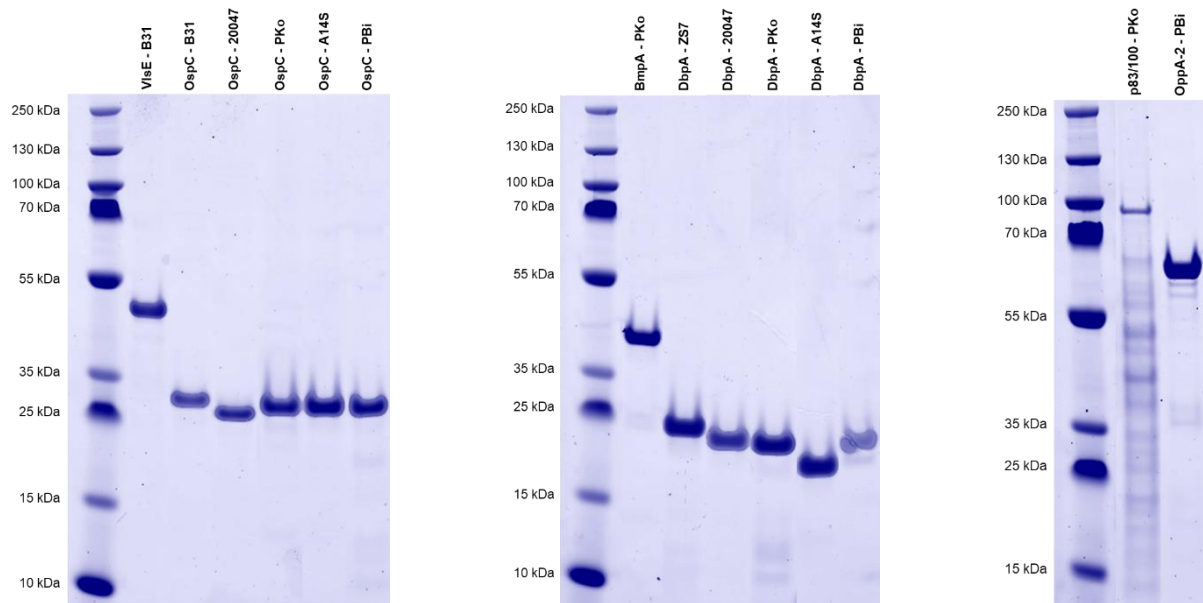
**Abbildung 7-17: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - II.**

Um die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung zu untersuchen, wurden sieben Borreliose-negative und vier Borreliose-positive Serum-Proben von Central BioHub in Einfachbestimmungen mit dem Borrelia multiplex gemessen. Für die verschiedenen IgG-dominanten Antigene wurden die MFI-Signale der IgG-Detektion betrachtet. Die Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.



**Abbildung 7-18: Reproduzierbarkeit der Immobilisierung - III.**

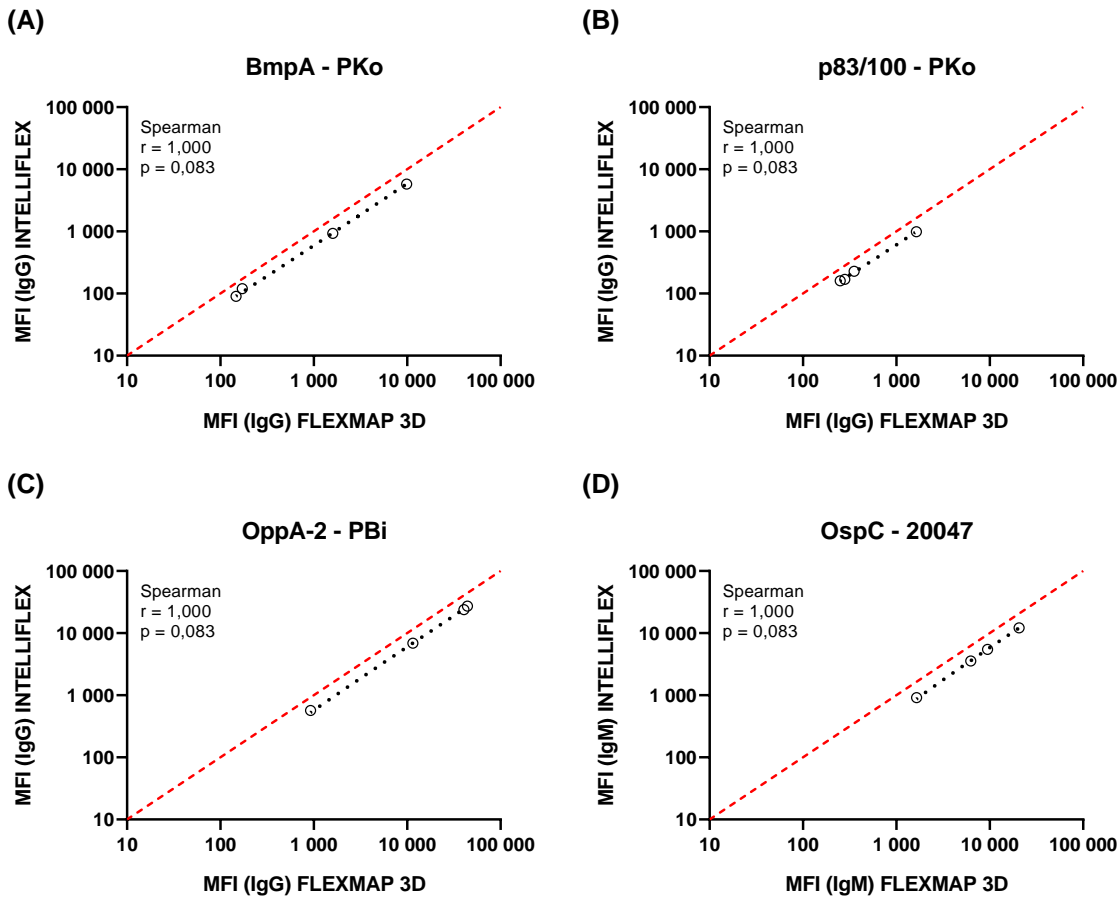
Um die Reproduzierbarkeit der Immobilisierung zu untersuchen, wurden sieben Borreliose-negative und vier Borreliose-positive Serum-Proben von Central BioHub in Einfachbestimmungen mit dem *Borrelia multiplex* gemessen. Für die IgG-dominanten DbpA-Antigene wurden die MFI-Signale der IgG-Detektion betrachtet. Die Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.

**SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle der finalen Antigen-Batches**

**Abbildung 7-19: Reinheitskontrolle der final verwendeten Antigen-Batches.**

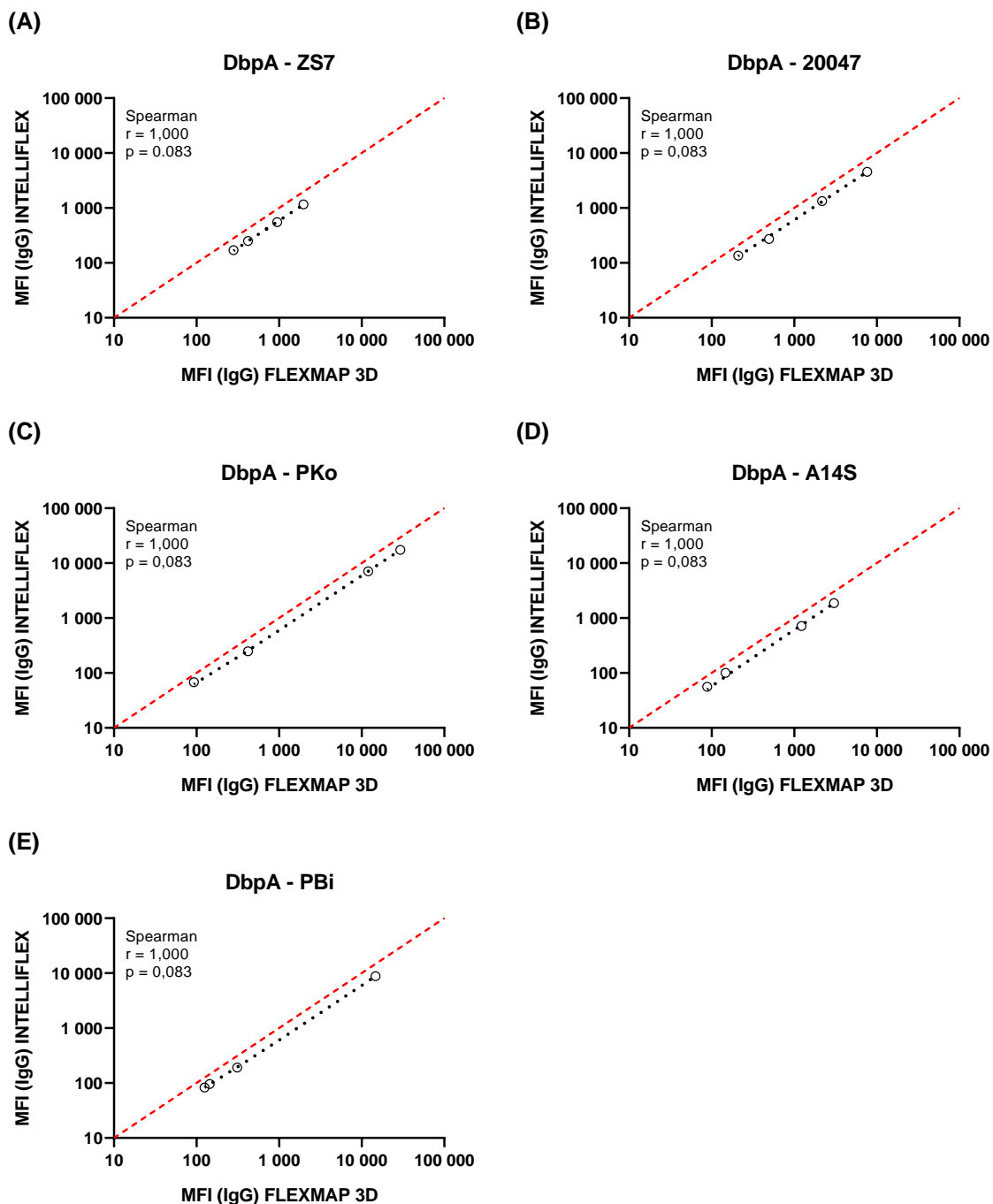
Um die Reinheit der final verwendeten Antigen-Batches zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Von jedem Antigen wurden 2 µg auf das Gel aufgetragen.

## FLEXMAP 3D versus INTELLIFLEX



**Abbildung 7-20: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - II.**

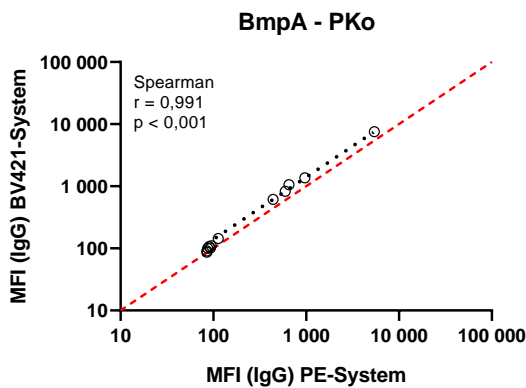
Um die Reporter Channel für das PE-konjugierte Detektionssystem zu vergleichen, wurden vier Borreliose-positive Serum-Proben mit dem Borrelia multiplex auf beiden Plattformen in Einfachbestimmungen gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für drei IgG-dominante Antigene **(A-C)** und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 **(D)**.



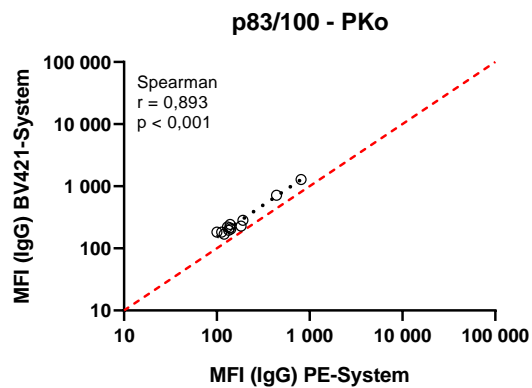
**Abbildung 7-21: Vergleich des PE - Reporter Channel von FLEXMAP 3D und INTELLIFLEX - III.**

Um die Reporter Channel für das PE-konjugierte Detektionssystem zu vergleichen, wurden vier Borreliose-positive Serum-Proben mit dem Borrelia multiplex auf beiden Plattformen in Einfachbestimmungen gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene.

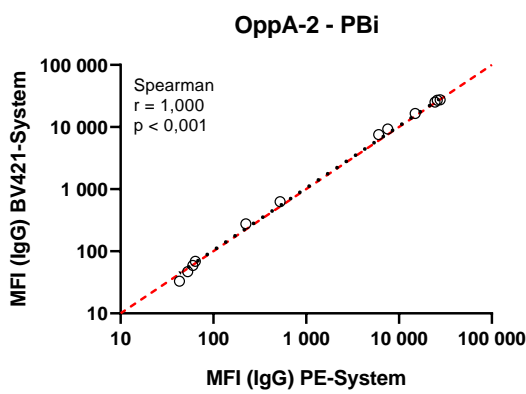
(A)



(B)



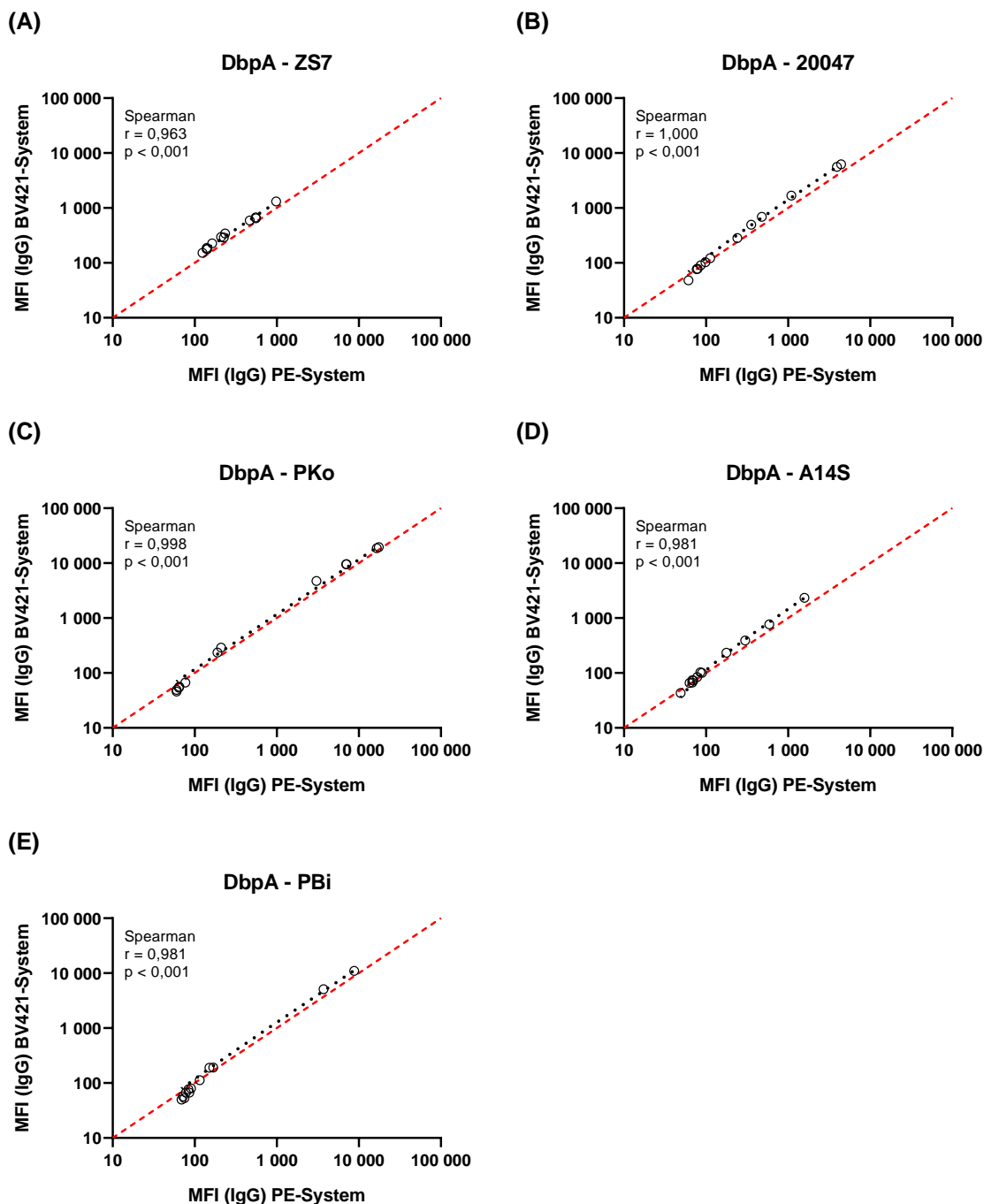
(C)



**Abbildung 7-22: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - II.**

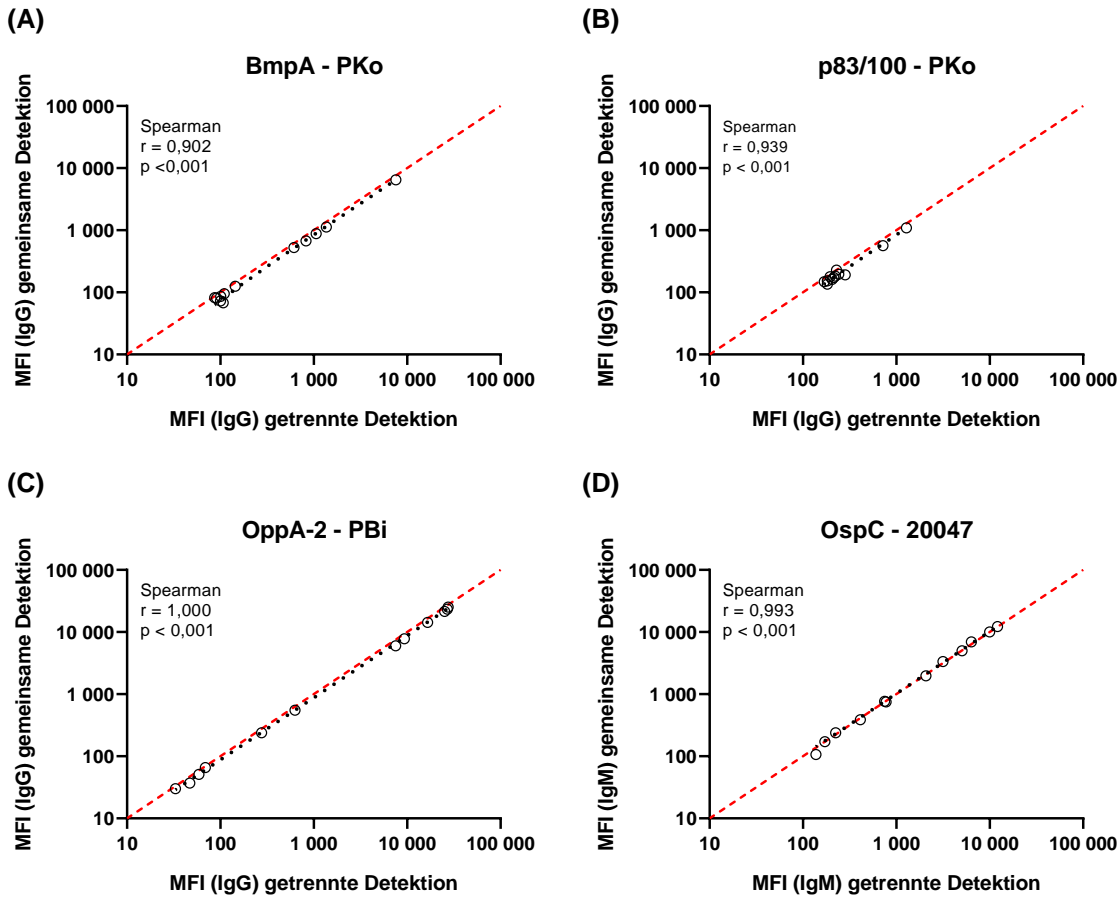
Für den Vergleich beider Detektionssysteme wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.





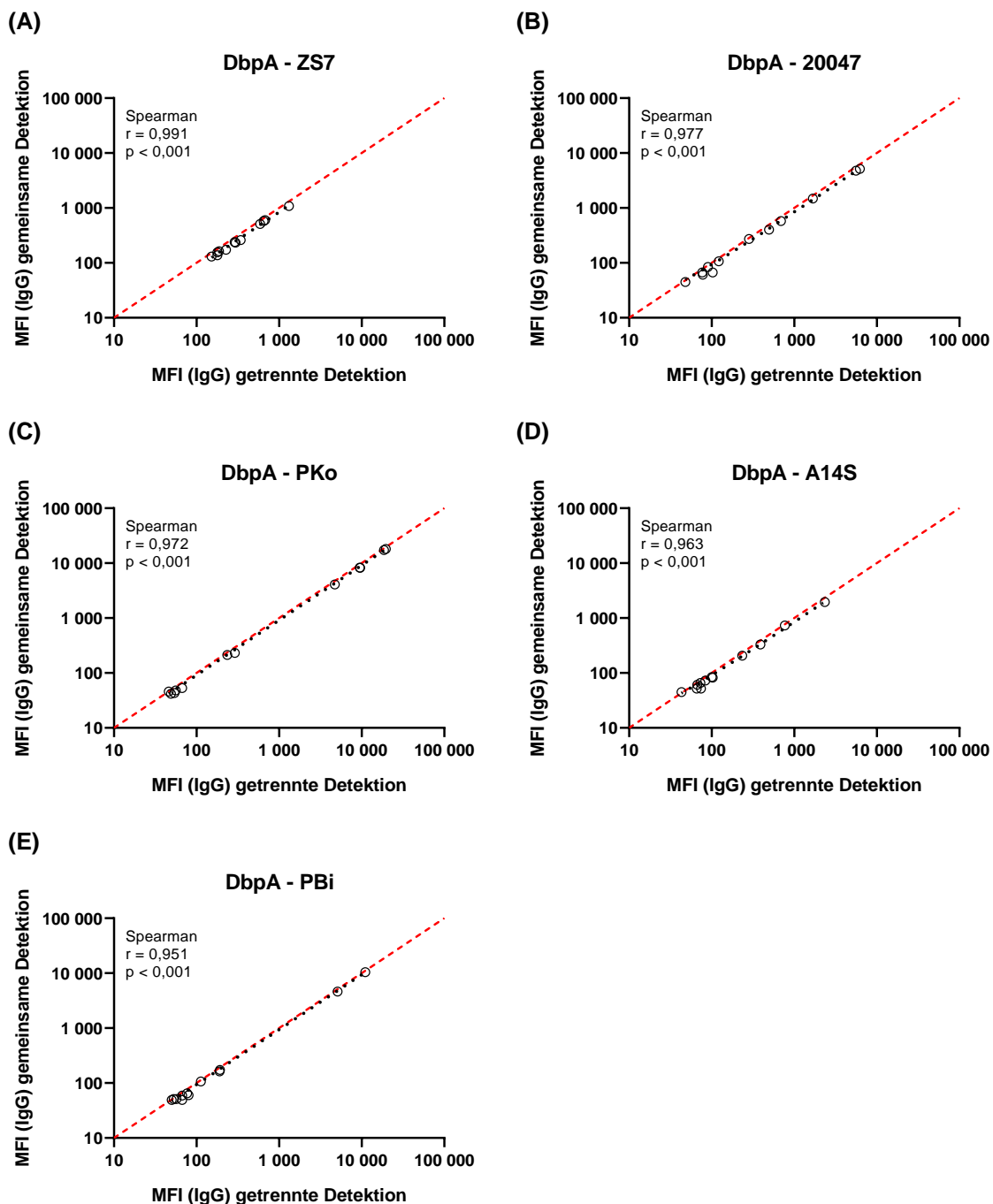
**Abbildung 7-23: Vergleich des PE-Systems zur IgG-Detektion mit dem BV421-Detektionssystem - III.**

Für den Vergleich beider Detektionssysteme wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen.



**Abbildung 7-24: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion - II.**

Für den Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem *Borrelia multiplex* in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für drei IgG-dominante Antigene **(A-C)** und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 **(D)**.

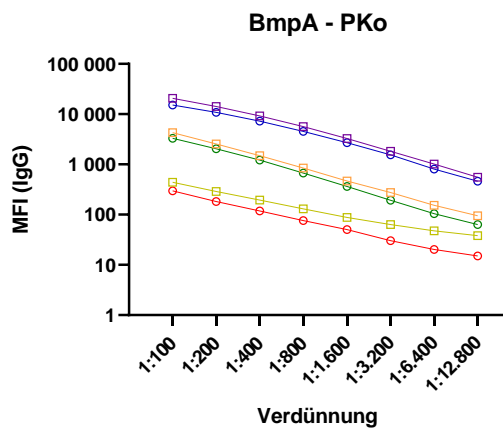


**Abbildung 7-25: Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion - III.**

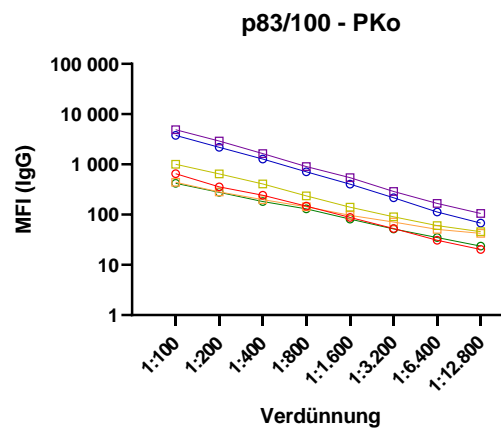
Für den Vergleich einer getrennten und gemeinsamen IgG/IgM-Detektion wurden acht Borreliose-positive und vier Borreliose-negative Serum-Proben mit dem Borrelia multiplex in Einfachbestimmungen auf der INTELLIFLEX gemessen. Die Proben stammten von Central BioHub und dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch. Die MFI-Signale wurden in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt und eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt. Die Korrelationsanalysen erfolgten nach Spearman. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene.

## Parallelität der Probenverdünnung - *Borrelia multiplex*

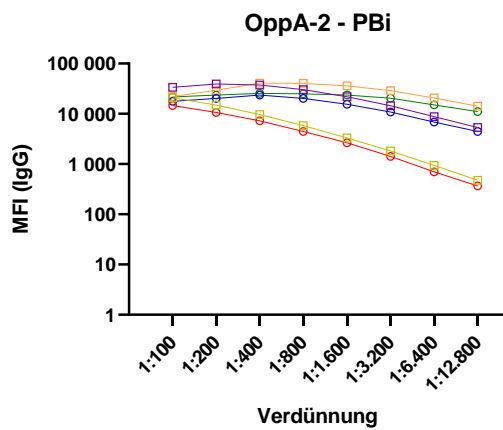
(A)



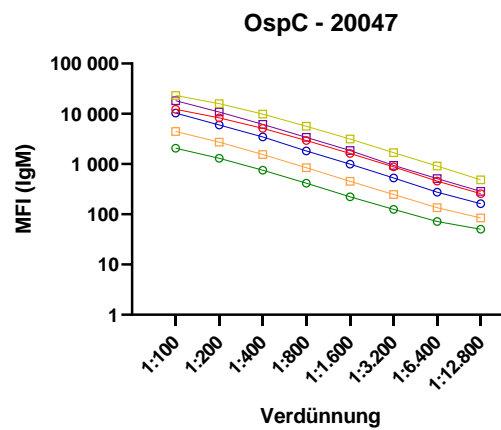
(B)



(C)



(D)



Serum-Validierungsprobe 2

— FLEXMAP 3D

— INTELLIFLEX

Serum-Validierungsprobe 3

— FLEXMAP 3D

— INTELLIFLEX

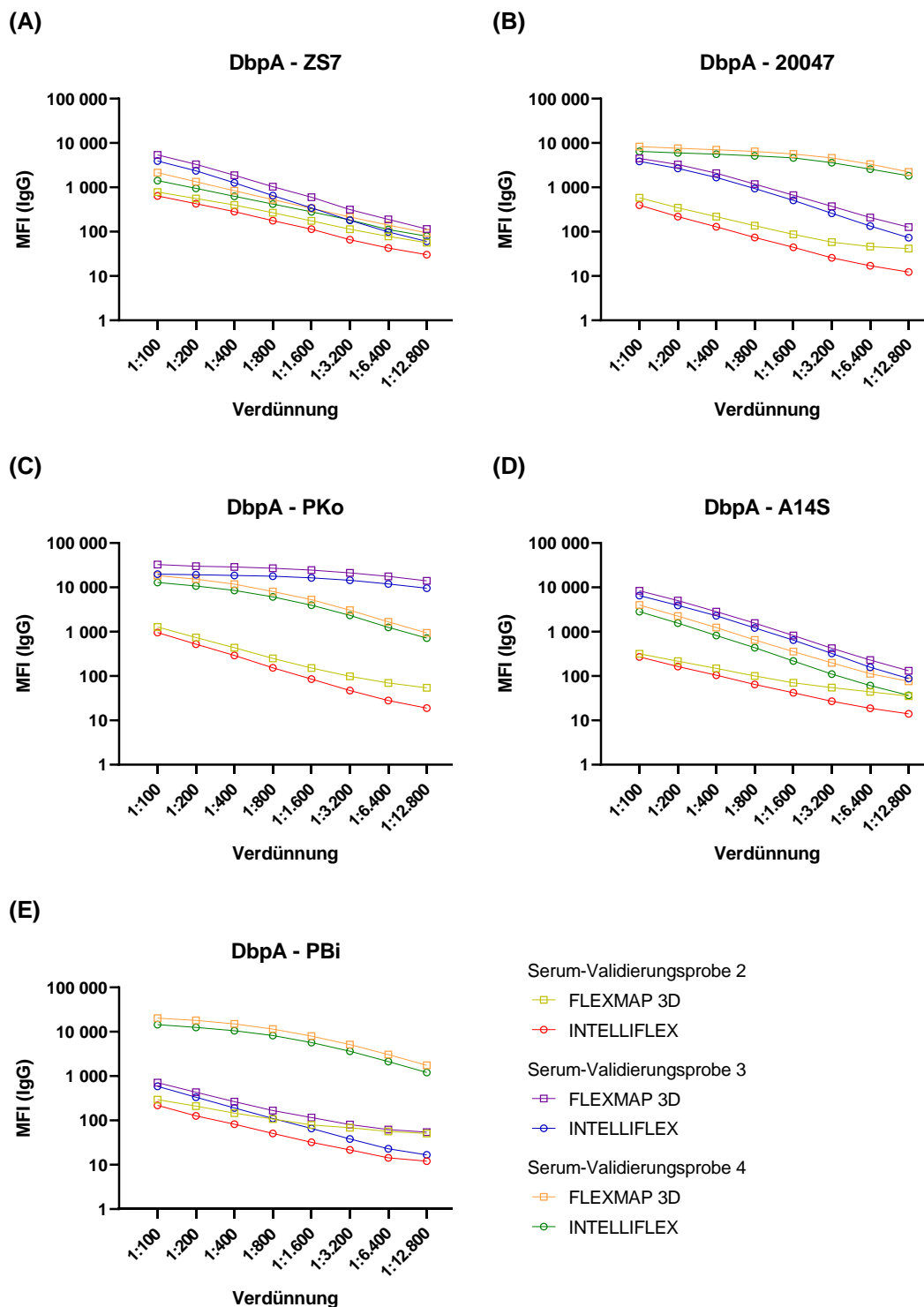
Serum-Validierungsprobe 4

— FLEXMAP 3D

— INTELLIFLEX

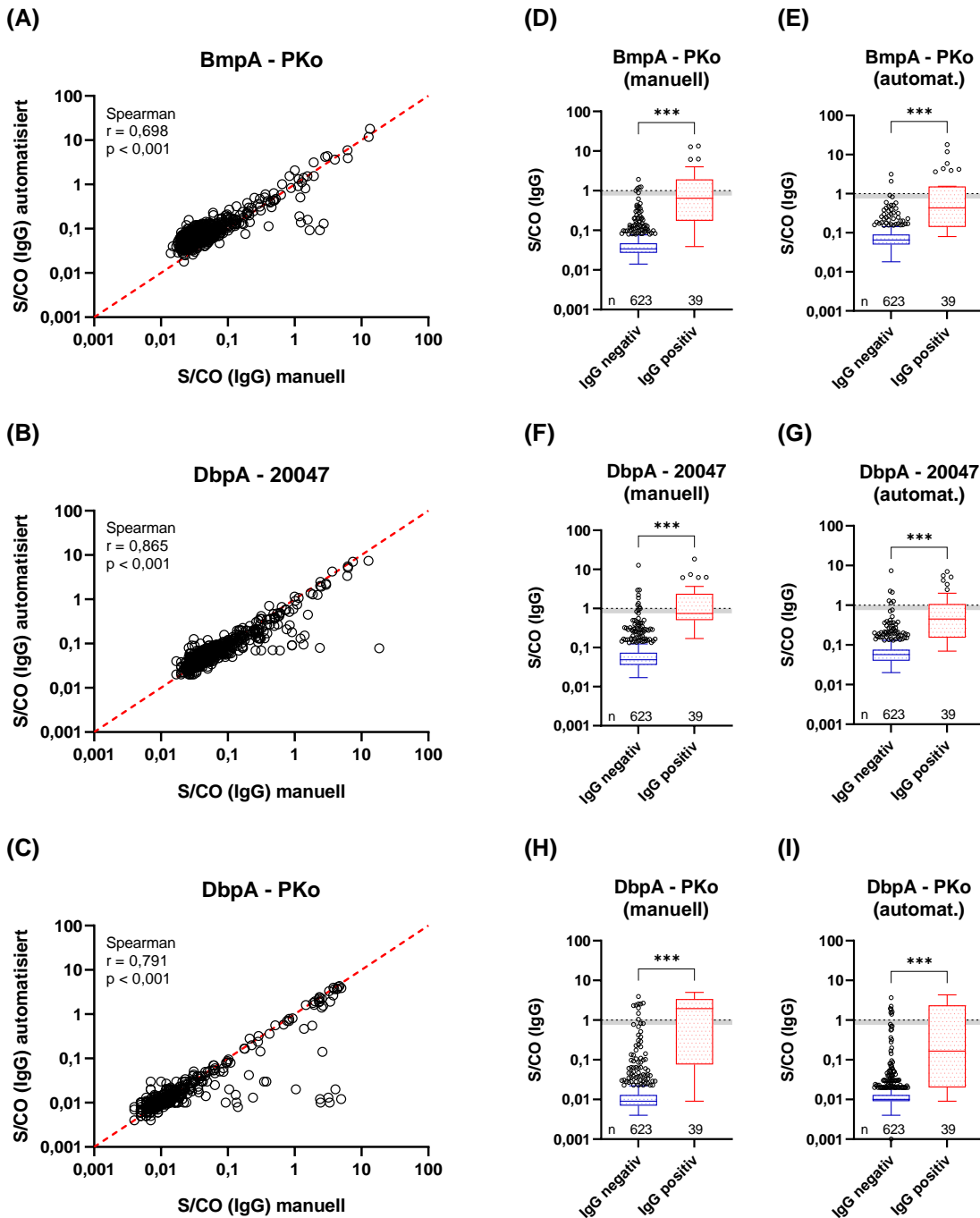
**Abbildung 7-26: Parallelität der Probenverdünnung im *Borrelia multiplex* - II.**

Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Die Messung erfolgte sowohl auf der FLEXMAP 3D als auch auf der INTELLIFLEX. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für drei IgG-dominante Antigene **(A-C)** und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 **(D)**. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.



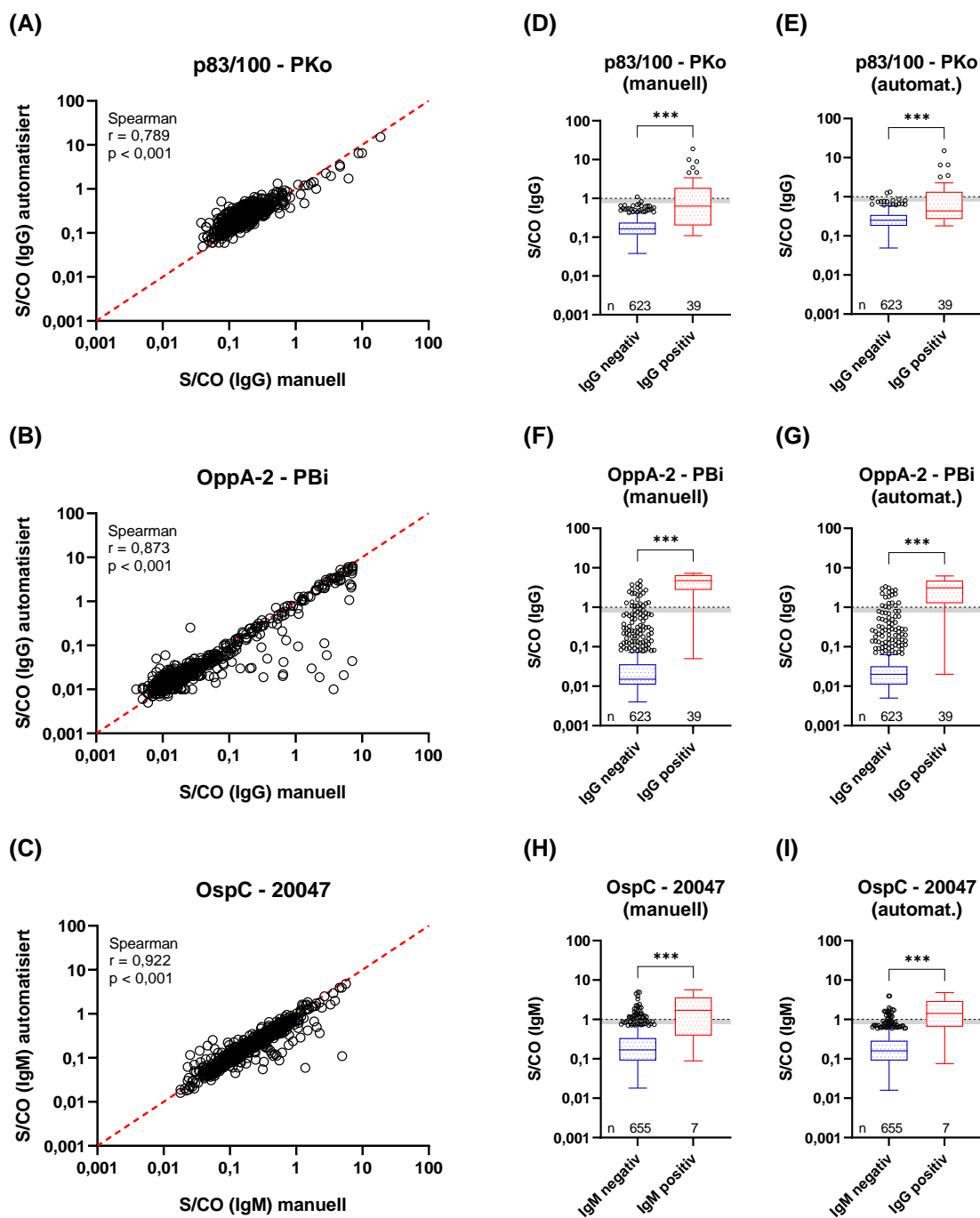
**Abbildung 7-27: Parallelität der Probenverdunnung im Borrelia multiplex - III.**

Um die Parallelität der Probenverdunnung zu untersuchen wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Die Messung erfolgte sowohl auf der FLEXMAP 3D als auch auf der INTELLIFLEX. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.

Assay-Automatisierung des *Borrelia multiplex*Abbildung 7-28: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des *Borrelia multiplex* - II.

Um eine manuelle Durchführung des *Borrelia multiplex* mit einer automatisierten Durchführung zu vergleichen, wurden 662 Serum-Proben der deutschen MuSPAD-Studie analysiert. Die Proben wurden auf der INTELLIFLEX gemessen. Für den Vergleich wurden die S/CO-Werte verwendet. In **(A-C)** sind die S/CO-Werte in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Die rote Gerade ( $x = y$ ) gibt den Fall identischer S/CO-Werte. Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. In **(D-I)** wird die Verteilung der S/CO-Werte betrachtet. Die Einteilung der Proben in IgG/IgM-negativ und -positiv basiert auf einer Messung der Proben mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik.

Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Die gestrichelte Linie (S/CO-Wert = 1,00) zeigt die Grenze zwischen positiven und negativen Werten. Der graue Bereich darunter gibt den Grenzbereich ( $0,75 < S/CO < 1,00$ ) an. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)



**Abbildung 7-29: Vergleich einer manuellen und automatisierten Durchführung des Borrelia multiplex - III.**

Um eine manuelle Durchführung des Borrelia multiplex mit einer automatisierten Durchführung zu vergleichen, wurden 662 Serum-Proben der deutschen MuSPAD-Studie analysiert. Die Proben wurden auf der INTELLIFLEX gemessen. Für den Vergleich wurden die S/CO-Werte verwendet. In **(A-C)** sind die S/CO-Werte in einem

doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Die rote Gerade ( $x = y$ ) gibt den Fall identischer S/CO-Werte. Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. In **(D-I)** wird die Verteilung der S/CO-Werte betrachtet. Die Einteilung der Proben in IgG/IgM-negativ und positiv basiert auf einer Messung der Proben mit einer kommerziellen 2-Stufen-Diagnostik. Die Boxen werden durch das 1. und 3. Quartil begrenzt. Die Mediane sind als Linien innerhalb der Boxen eingezeichnet. Die Antennen sind auf das 1,5-fache des IQR begrenzt. Signale darüber oder darunter sind als einzelne Punkte dargestellt. Die gestrichelte Linie (S/CO-Wert = 1,00) zeigt die Grenze zwischen positiven und negativen Werten. Der graue Bereich darunter gibt den Grenzbereich ( $0,75 < \text{S/CO} < 1,00$ ) an. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney Test. Die angegebenen Signifikanzen sind wie folgt definiert:  $p > 0,05$  (ns),  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)



## Erweiterung des 2-Schritt-Assays zur IgG/IgM-Detektion

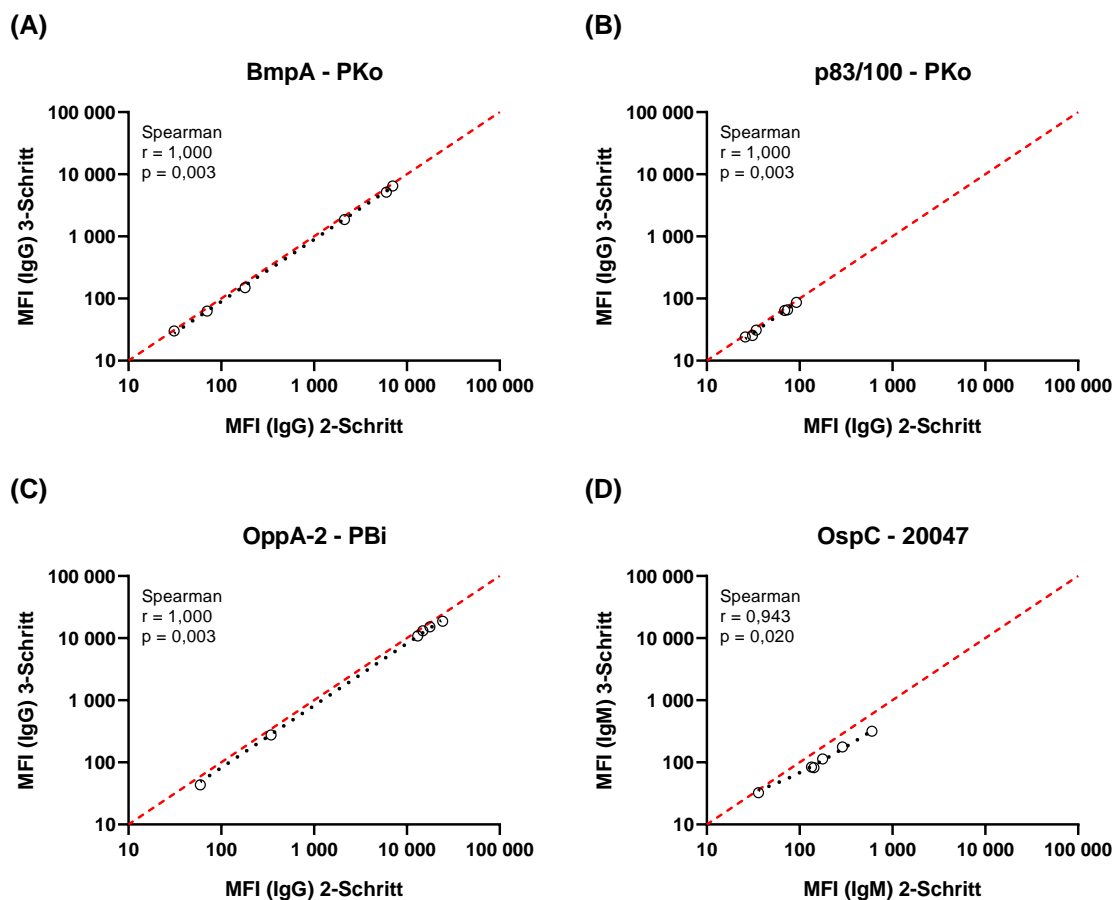
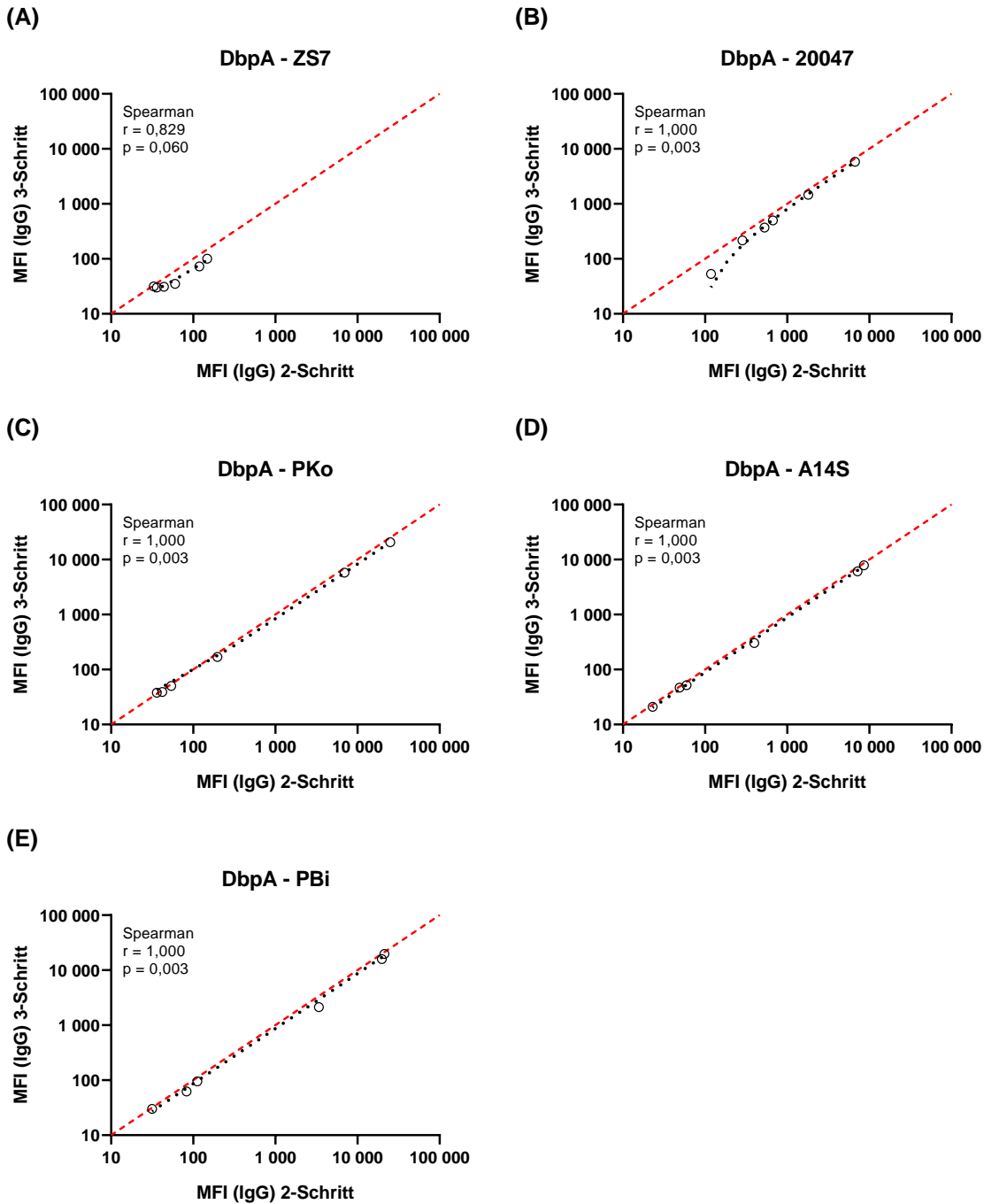


Abbildung 7-30: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay-Formaten - II.

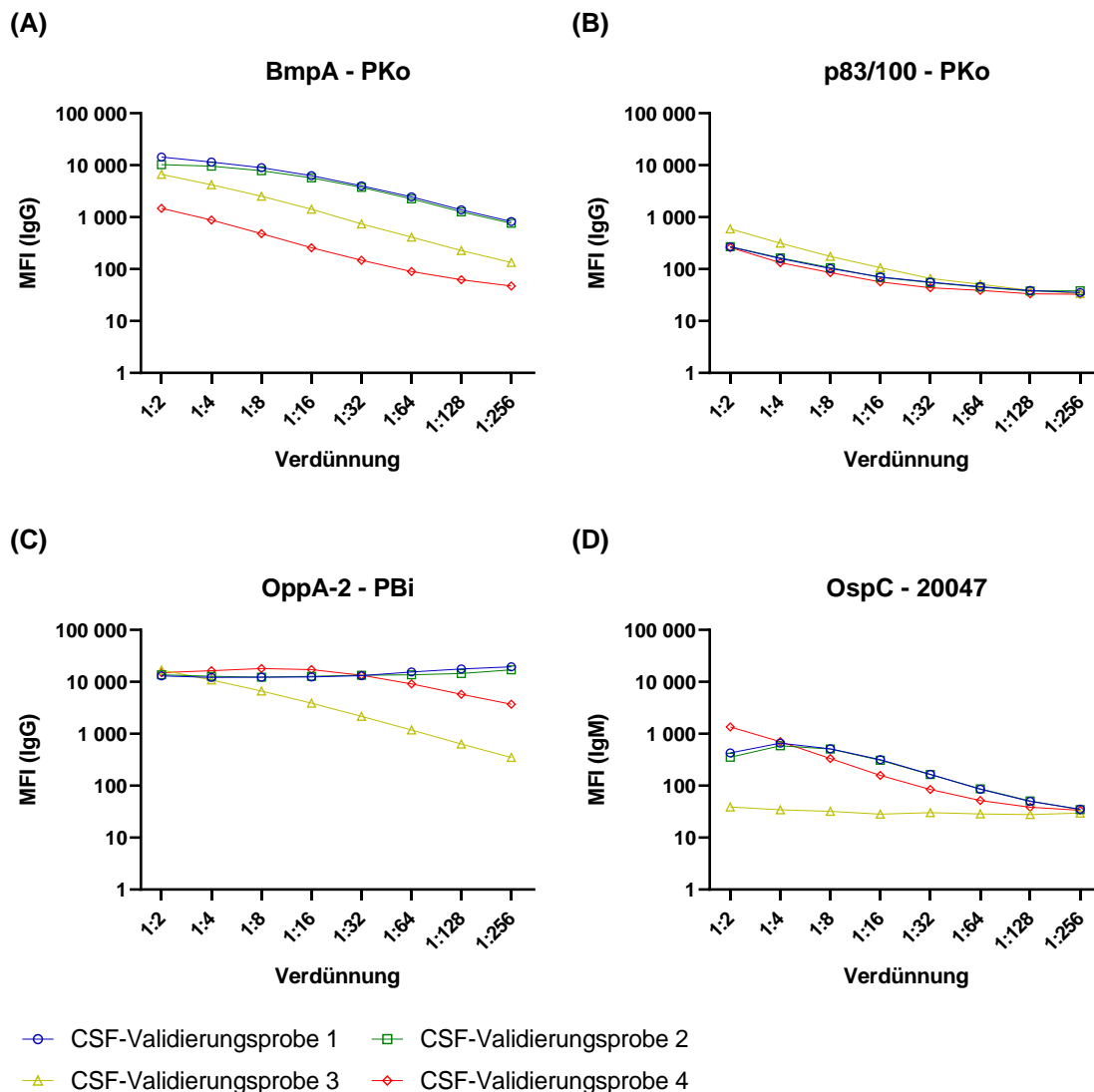
Für den Vergleich eines 2-Schritt-Assays und eines 3-Schritt-Assays zur IgG/IgM-Detektion wurden sechs Borreliose-positive Serum-Proben aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch verwendet. Die Proben wurden in Einfachbestimmungen gemessen und die MFI-Signale in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Zudem wurde eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt und eine Korrelationsanalyse nach Spearman vorgenommen. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für drei IgG-dominante Antigene (A-C) und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 (D).



**Abbildung 7-31: Vergleich der IgG/IgM-Detektion bei unterschiedlichen Assay-Formaten - III.**

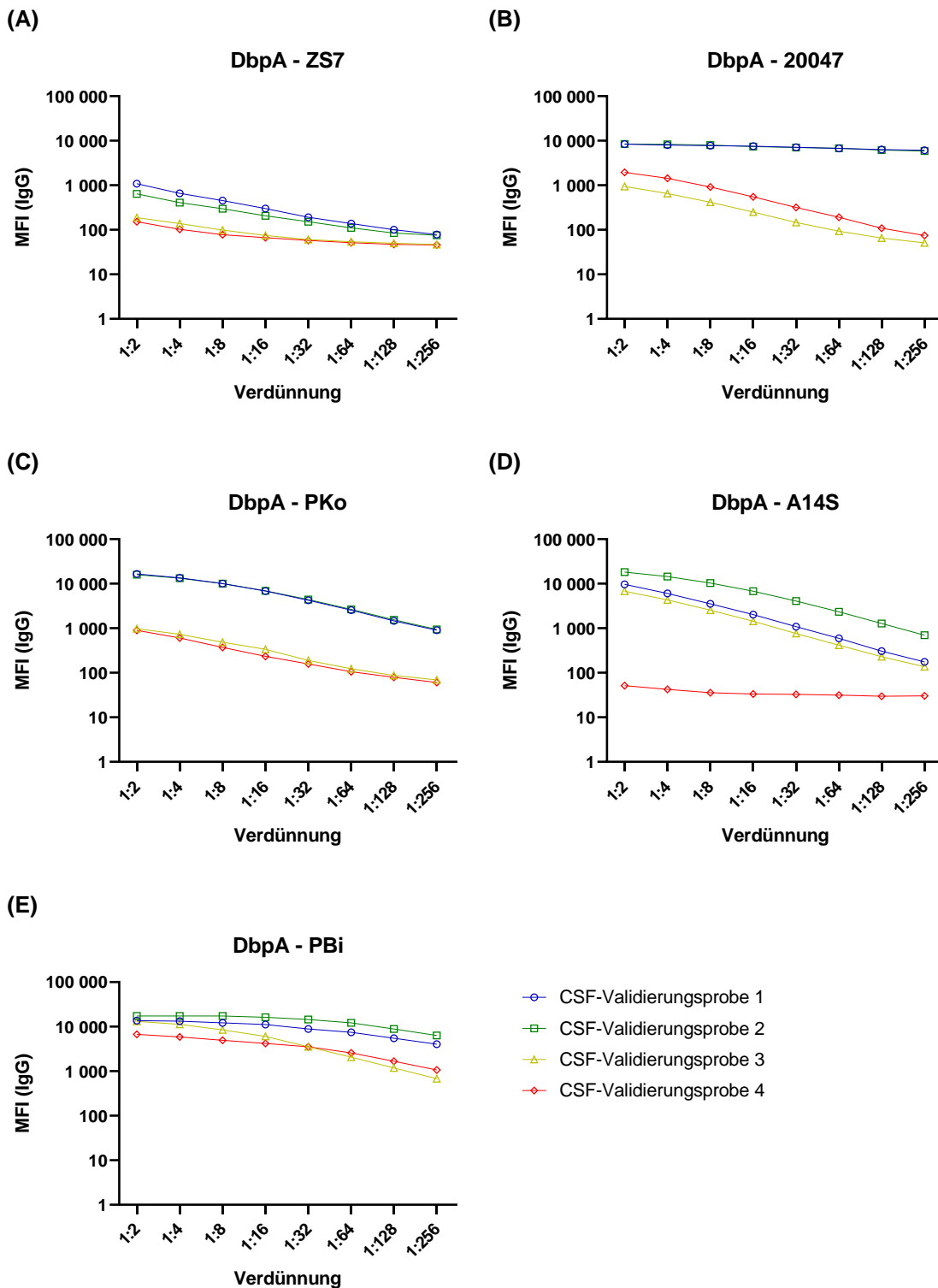
Für den Vergleich eines 2-Schritt-Assays und eines 3-Schritt-Assays zur IgG/IgM-Detektion wurden sechs Borreliose-positive Serum-Proben aus dem Sächsischen Krankenhaus Rodewisch verwendet. Die Proben wurden in Einfachbestimmungen gemessen und die MFI-Signale in einem doppelt-logarithmischen Streudiagramm dargestellt. Zudem wurde eine lineare Regressionsgerade (schwarze Linie) eingefügt und eine Korrelationsanalyse nach Spearman vorgenommen. Jeder Datenpunkt steht für eine Probe. Eine rote Gerade ( $x = y$ ) spiegelt den Fall identischer MFI-Signale wieder. Zudem sind der berechnete Korrelationskoeffizient  $r$  und der  $p$ -Wert angegeben. Bei einem  $p$ -Wert  $> 0,05$  wird die Korrelation als statistisch nicht signifikant angesehen. Gezeigt wird der Vergleich für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene.

**Parallelität der Probenverdünnung - Borrelia neuroplex**



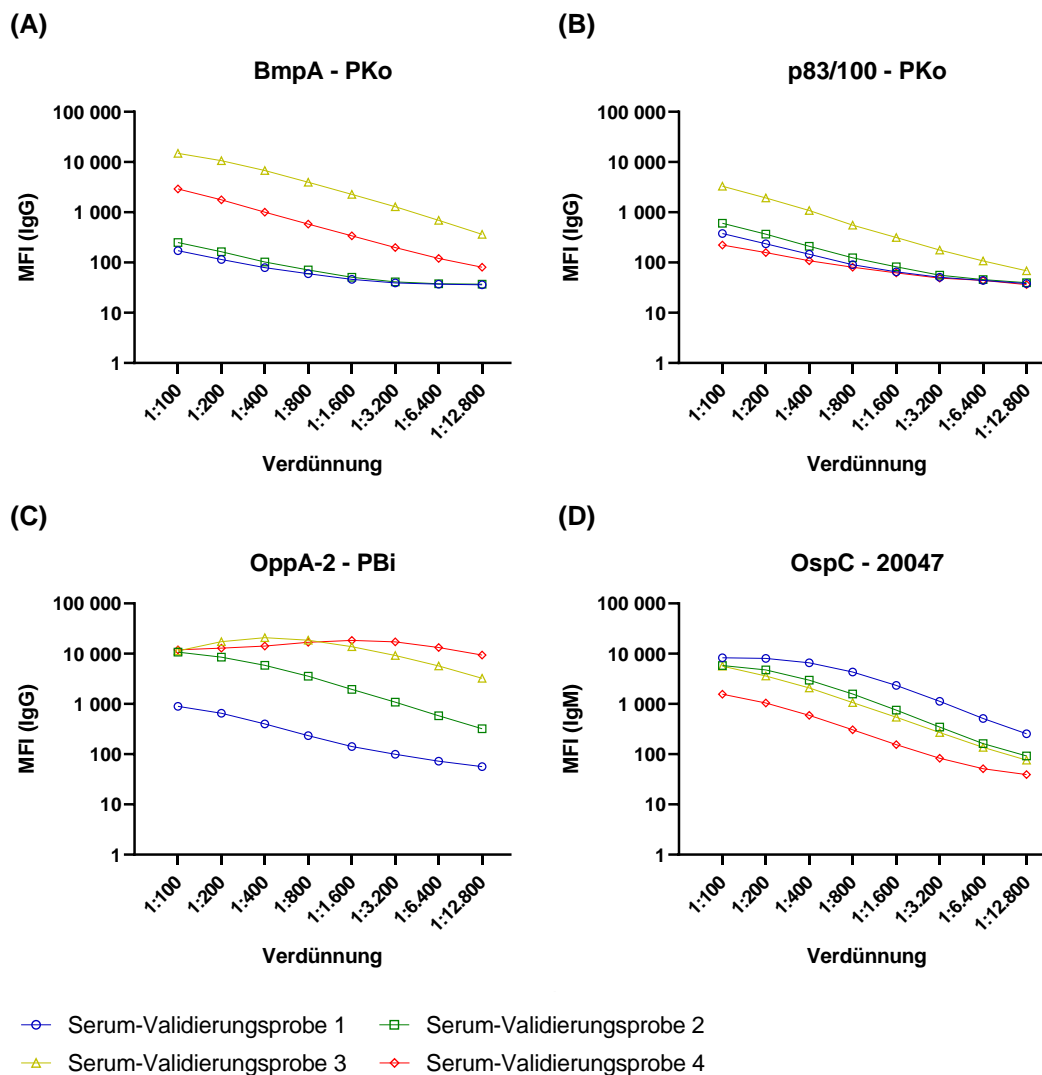
**Abbildung 7-32: Parallelität der CSF-Probenverdünnung Borrelia neuroplex (IgG/IgM-Detektion) - II.**

Um die Parallelität der CSF-Probenverdünnung bei der IgG/IgM-Detektion des Borrelia neuroplex zu untersuchen, wurden die CSF-Validierungsproben 1 - 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für drei IgG-dominante Antigene (A-C) und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 (D). Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.



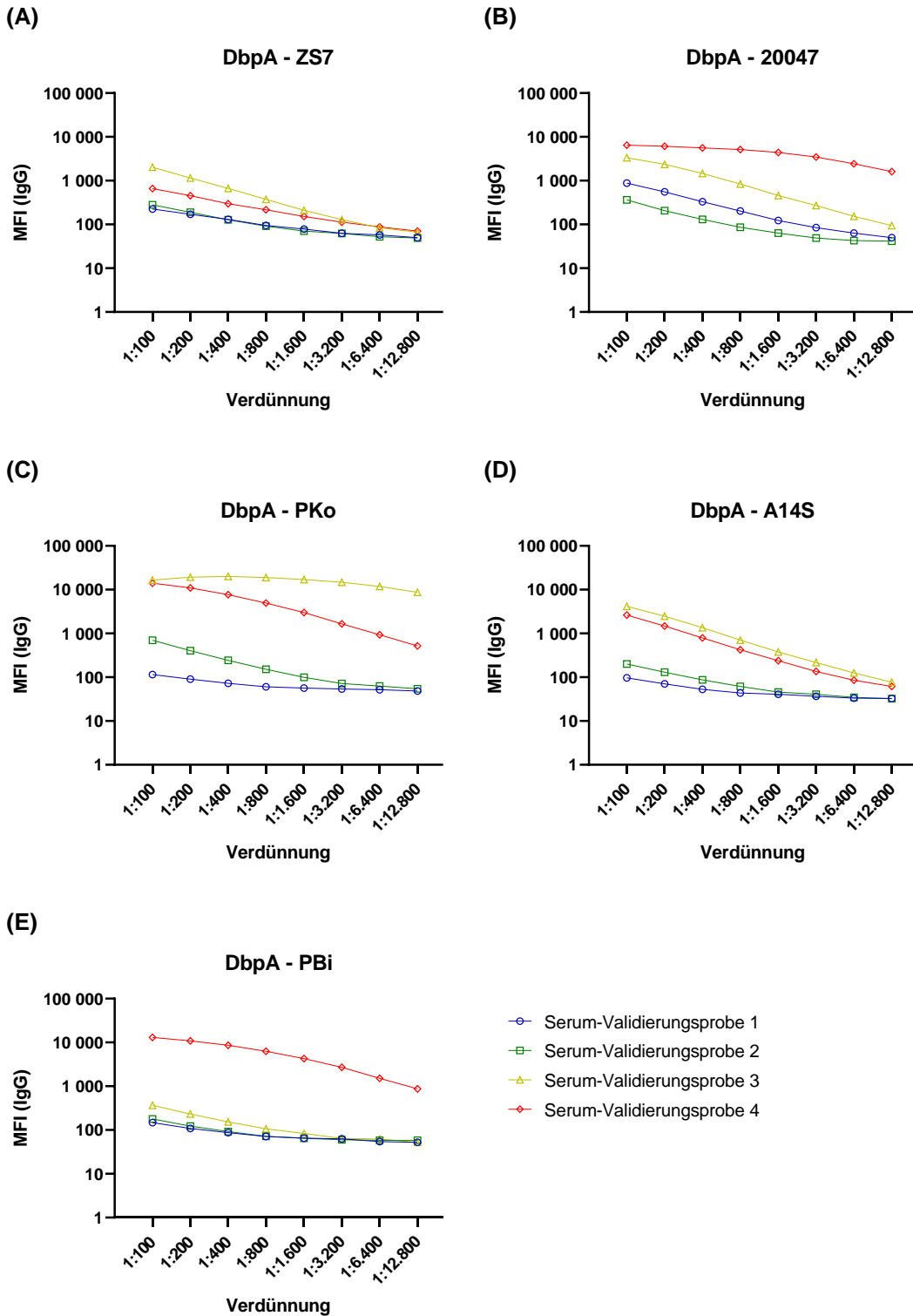
**Abbildung 7-33: Parallelität der CSF-Probenverdünnung *Borrelia neuroplex* (IgG/IgM-Detektion) - III.**

Um die Parallelität der CSF-Probenverdünnung bei der IgG/IgM-Detektion des *Borrelia neuroplex* zu untersuchen, wurden die CSF-Validierungsproben 1 - 4 in einer seriellen Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:256 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.



**Abbildung 7-34: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im *Borrelia neuroplex* - II.**

Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für drei IgG-dominante Antigene **(A-C)** und das IgM-dominante Antigen OspC - 20047 **(D)**. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.



**Abbildung 7-35: Parallelität der Serum-Probenverdünnung im *Borrelia neuroplex* - III.**

Um die Parallelität der Probenverdünnung zu untersuchen, wurden die Serum-Validierungsproben 2, 3 und 4 in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:12.800 gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Triplikaten inklusive der SD für die verschiedenen IgG-dominanten DbpA-Antigene. Es wurde eine doppelt-logarithmische Darstellung gewählt.