

Validität der Standardverfahren in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und Einfluß methodischer Varianten

Validity of the Standard Assays in the Serodiagnosis of Lyme borreliosis and Effects of Methodical Modifications

L. Zöller, M. Haude, H.-G. Sonntag

Hygiene-Institut der Universität Heidelberg

Zusammenfassung:

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) und der Festphasenenzymimmunttest (EIA) mit Ultrasonicationen von *Borrelia burgdorferi* als Antigen sind gegenwärtig die am häufigsten verwendeten Standardverfahren in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose. Beide Verfahren wurden anhand von Durchschnittskollektiven sowie von Patienten mit einer klinisch definierten Früh- bzw. Spätstadiumborreliose validiert. Dabei zeigte sich eine starke Überschneidung der Titerverteilungskurven der Kranken und Gesunden, so daß optimale Sensitivitäts- und Spezifitätswerte nicht erreicht werden konnten. Der maximale prädiktive Wert des Immunfluoreszenztests von 0,83 wurde bei einem Kollektiv mit hoher Antikörperprävalenz erst bei einem Grenztiter von 1:2048 erreicht. Die Ergebnisse von IFT und EIA korrelierten gut (Korrelationskoeffizient 0,85; 90 % Konkordanz). Bei Verwendung zweier verschiedener europäischer Isolate von *B. burgdorferi* als Antigene ergaben sich keine signifikanten Titerunterschiede, während mit dem Stamm B31 im Mittel niedrigere Titer erzielt wurden. Die Spezifität des IFT-abs. und des EIA-abs. wurde mit zwei kommerziellen *Treponema phagedenis*-Absorbentien (Absorbens der Fa. Bios und Ultrasorbent der Fa. BAG) evaluiert. Während mit dem Bios-Absorbens keine signifikante Verbesserung der Spezifität erreicht wurde, erwies sich das Ultrasorbent als geeignetes Absorptionsmedium zur Verbesserung der Spezifität in der Diagnostik der Borreliose. Die Ergebnisse der nach Ultrasorben-Absorption durchgeführten Tests korrelierten sehr gut mit denen des Westernblot. Die diagnostische Sensitivität für die Stadium I- und II-Borreliose wurde allerdings durch die Absorption erheblich reduziert. Keines der Absorbentien war in der Lage, die Kreuzreaktion durch Lues-spezifische Antikörper vollständig zu beseitigen.

Schlüsselwörter:

Borrelia burgdorferi – Lyme-Borreliose – Immunfluoreszenztest – Enzymimmunttest – Westernblot – Absorption

Summary:

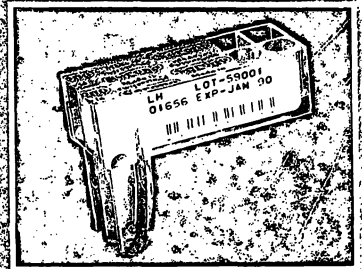
The indirect immunofluorescence assay (IFA) and the solid phase enzyme immunoassay (EIA) using ultrasonicates of *Borrelia burgdorferi* as antigens are today the most widely used assays in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Both tests were evaluated by testing average populations as well as patients suffering from defined clinical symptoms of early or late stage borreliosis. The distributions of antibody titers in the diseased and not diseased samples were widely overlapping thus preventing optimal sensitivity and specificity parameters of the tests. The highest predictive value (0.83) of the IFA in the high-prevalence sample was obtained at a cutoff titer of 1:2048. Results of both assays correlated well (correlation coefficient 0.85; 90 % total agreement). Using two European isolates of *B. burgdorferi* as antigens we could not find any significant differences of titers, whereas lower titers were found with the B31 strain. The specificity of the IFA-abs. and the EIA-abs. was evaluated by use of two commercially available *Treponema phagedenis*-sorbents (Bios, Munich and Ultrasorbent, BAG, Lich). While no significant improvement of specificity could be achieved by use of the Bios sorbent, the Ultrasorbent was found to increase specificity and to provide high correlation of test results with the Westernblot. The diagnostic sensitivity for stage I- and II-borreliosis, however was strongly reduced by this sorbent. None of the sorbents was suitable to completely remove syphilis-specific cross-reactive antibodies.

Keywords:

Borrelia burgdorferi – Lyme-borreliosis – immunofluorescence assay – enzyme immunoassay – Westernblot – absorption

Diagnostische Transparenz. Das ELA-Testsystem der neuen Generation!

SERONO



- Vollständig automatisierter Testablauf.
 - Steuerung aller Gerätefunktionen elektronisch optimiert.
 - Ausgereifte Datenverarbeitung.
 - Vielfältige Möglichkeiten der Datenausgabe.
 - kompaktes Tischformat.
- Tests auf den Bereichen:**
- Fertilitätsdiagnostik.
 - Schwangerschaftsdiagnostik.
 - Schilddrüsendiagnostik.
 - Stoffwechseldiagnostik.
 - Tumortherapieüberwachung.

Serono
DIAGNOSTIC

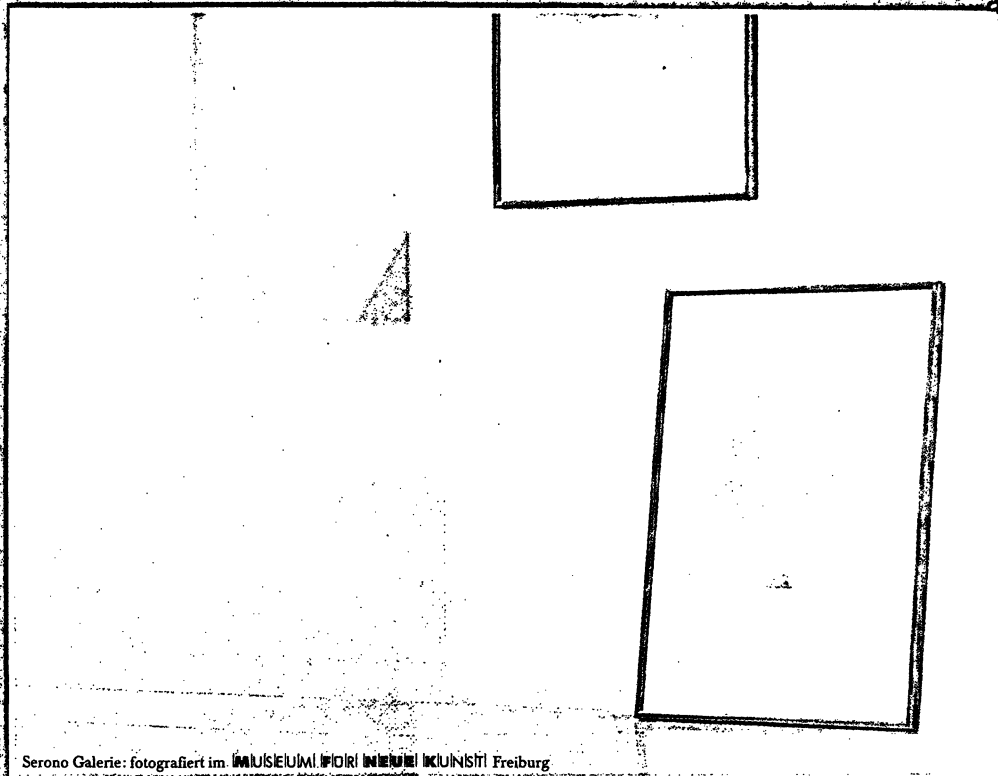
**Erfahrung
schafft
Fortschritt®**

In Deutschland:
Serono Diagnostica GmbH
Menzhausenstraße 84
D-7800 Freiburg
Tel.-Zentrale (0761) 4105-0

In Österreich:
Serono Diagnostica GmbH
Informationsbüro Wien
Maria Theresienstr. 1
A-1040 Wien
Telefon (0670) 4105-0



SEROZYME GALERIE MODERNER PERFEKTION.



Serono Galerie: fotografiert im MUSEUM FÜR NEUE KUNST Freiburg

Enzym- Immunoassays von Serono Diagnostika.

Sterilitäts- diagnostik

FSH-SEROZYME
LH-SEROZYME
Progesteron-SEROZYME
Prolaktin-SEROZYME

Schwangerschafts- überwachung

AFP-SEROZYME
HCG-SEROZYME
NEU:
f-Estriol-SEROZYME

Schilddrüsen- diagnostik

TSH-SEROZYME
T3-SEROZYME
T4-SEROZYME
T3-Uptake-SEROZYME

Tumordiagnostik/ Tumornachsorge

AFP-SEROZYME
CEA-SEROZYME
HCG-SEROZYME

Stoffwechsel/ Verschiedenes

NEU:
Cortisol-SEROZYME
Digitoxin-SEROZYME
Digoxin-SEROZYME
Ferritin-SEROZYME
Gesamt-IgE-SEROZYME

Jetzt neu:

SEROZYME
für Östradiol,
FT 3, FT 4.

In Deutschland:
Serono Diagnostika GmbH
Merzhauser Str. 134, D-7800 Freiburg
Tel. Zentrale (07 61) 4 01 67-0

Serono
DIAGNOSTICS

Erfahrung schafft Fortschritt®

In Österreich:
Serono Diagnostika GmbH
Informationsbüro Wien
Diesterweggasse 13, A-1140 Wien
Telefon (02 22) 82 03 78

Ich bitte um Informationen zu:

Name

Institut

Einleitung

Die Diagnose der Lyme-Borreliose beruht in erster Linie auf der klinischen Anamnese und Symptomatik. Da diese allerdings insbesondere in den Spätstadien der Borreliose meist zahlreiche Differentialdiagnosen zuläßt, werden serologische Verfahren zur Abklärung der Ätiologie herangezogen. Mittlerweile steht eine große Palette kommerzieller Testkits zur Verfügung. Breiteste Anwendung finden zur Zeit noch die Tests der ersten Generation wie der Indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) und der Enzymimmunttest (EIA), bei denen ganze Borrelienzellen (IFT) oder Ultrasonicate (EIA) von *Borrelia burgdorferi* als Antigene verwendet werden (1, 2, 3). Bei beiden Methoden besteht allerdings eine beträchtliche Unsicherheit bezüglich ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität (4, 5). Dies rührt zum einen von einem teilweise hohen Prozentsatz positiver Antikörpertiter in der Allgemeinbevölkerung (6, 7, 8, 9), deren Bedeutung (Durchseuchungstiter, latente oder „okkulte“ Borreliose) bislang nicht ausreichend geklärt ist, zum anderen von der bekannten Kreuzreaktivität von *B. burgdorferi* mit antigenverwandten Keimen (apathogene Treponemen, andere Bakterien) (10). Allein die Lues als Ursache kreuzreagierender Antikörper läßt sich durch einen Lues-spezifischen Test wie den TPHA sicher ausschließen. Insbesondere die Anwendung des Westernblot als Bestätigungstest hat gezeigt, daß manche „positive“ Seren das für das jeweils in Frage kommende Stadium der Borreliose charakteristische Bandenmuster vermissen lassen (11). Die Absorption der Seren mit *T. phagedenis* wurde vorgeschlagen, um die Spezifität der Tests zu verbessern (12). In den USA wurde dies allerdings wegen der relativ entfernten Verwandtschaft zwischen *B. burgdorferi* und *T. phagedenis* als ungeeignete Methode abgelehnt (1, 13). Ein Dilemma ist nach wie vor die fehlende Festlegung der Borreliosediagnostik auf standardisierte Verfahren. Im folgenden wird die diagnostische Validität der Borrelioseantikörpertestverfahren der ersten Generation insbesondere auch im Hinblick auf methodische Varianten (Verwendung unterschiedlicher Borrelienstämmen, Absorption) bewertet.

Material und Methoden

Immunfluoreszenztest (IFT)

Die Borrelienstämmen TN⁺ (Dr. Preac-Mursic, München), N34 (Prof. Ackermann, Köln) und B31 (ATCC # 35210) wurden in BSK-Medium kultiviert (14). Spirochäten von 4 bis 6 Tage alten log-Phase-Kulturen wurden durch dreißigminütiges Zentrifugieren bei 10000 g sedimentiert und anschließend unter den gleichen Bedingungen dreimal in Waschpuffer (0,1% MgCl₂ in PBS) gewaschen. Das letzte Sediment wurde in Beschichtungspuffer (0,1% MgCl₂, 0,5% Rinderserumalbumin in PBS) aufgenommen. Mit dieser Antigensuspension beschichtete Mehrfeldglasobjektträger (Hözl) wurden luftgetrocknet und anschließend für 10 Minuten mit Aceton fixiert. Die Testdurchführung folgte Standardmethoden. Als Zweitantikörper wurden FITC-gekoppelte anti-human-IgG- bzw. -IgM-Antikörper von der Ziege (Dianova, Hamburg) verwendet. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte mit einem Leitz Epifluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 630x mit einem Fluoreszenz-Ölimmersionsobjektiv.

Enzymimmunttest

Die Spirochäten wurden kultiviert und gewaschen wie oben beschrieben. Das letzte Sediment wurde in PBS resuspendiert und mit einem Branson-Sonicator bei Stufe

5 intermittierend für 8 Minuten beschallt. Die Suspension wurde bei 10000 g sedimentiert und der Überstand gewonnen. Die Vertiefungen von PVC-Mikrotiterplatten (Microplate Flow) wurden über Nacht bei 4 °C mit 500 ng Protein in Natriumcarbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet und anschließend mit einer Lösung von 1% (w/v) Rinderserumalbumin in PBS blockiert. Die Seren wurden 1:500 in Verdünnungspuffer (0,05% Tween 20, 0,5% (w/v) RSA in PBS, pH 7,2) vorverdünnt. Die Erstinkubation erfolgte mit 100 µl der Serumverdünnung pro Vertiefung der Mikrotiterplatte für 45 Minuten bei 37 °C. Die Platten wurden dann dreimal mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) gewaschen. 100 µg eines Alkalische Phosphatasegekoppelten anti-human-IgG (H, L) Konjugats von der Ziege (Dianova, Hamburg) wurden in einer Verdünnung von 1:3000 zugegeben und die Platte für weitere 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschzyklen wurde der Test durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (8 Tabletten PNPP in 10 ml Substratpuffer, bestehend aus 0,5 mM MgCl₂, 10% (v/v) Diäthanolamin in a. d., pH 9,8) entwickelt. Nach 45minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Test durch Zugabe von 50 µl 3 N NaOH je Vertiefung gestoppt und in einem Plattenphotometer (Dynatech) bei einer Wellenlänge von 405 nm abgelesen. Der Grenzwert wurde anhand der auch zur Evaluation des IFT benutzten Kontrollkollektive bestimmt (vgl. Resultate). Dem Grenzwert wurde arbiträr eine Konzentration von 200 Standardeinheiten zugewiesen. Verschiedene Verdünnungsstufen eines positiven Serumpools bekannter Antikörperkonzentration (Standardeinheiten) wurden mitgeführt, die gemessenen Absorptionen gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen und die resultierende Eichkurve mit Hilfe des Beckman-ImmunoFit-Programms durch eine Vier-Parameter-Logistik-Funktion der Form $y = (A-D)/(x/C)^B + D$ angenähert.

Absorption mit *T. phagedenis*

Die Seren wurden im Verhältnis 1:5 mit *T. phagedenis*-Absorbens verdünnt (Fa. Bios, München [B] bzw. Ultrasorbent [Sonicat] der Fa. BAG, Lich [US]), für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, anschließend für 2 Minuten in der Mikrozentrifuge zentrifugiert und dann wie oben beschrieben mit dem entsprechenden Verdünnungspuffer für die Tests weiterverdünnt.

TPHA

Der TPHA (Mast) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Immunblot

Die Durchführung der Westernblots, die teilweise als Referenztests herangezogen wurden, erfolgte wie kürzlich beschrieben (14). Die verwendeten Interpretationskriterien sind Gegenstand einer anderen Arbeit (20). Ein Blot wurde nur dann als positiv bewertet, wenn nach von uns erarbeiteten Kriterien eine Kombination von mehreren Hauptantigenen von *Borrelia burgdorferi* erkannt wurde. Dabei wurde eine deutliche Reaktion (OD 0,2–0,4) mit dem 100 KD Protein für die Diagnose einer Stadium-III-Borreliose verlangt.

Seren

Die Seren des Serumkollektivs 1 (n = 1017) erhielten wir im Rahmen einer Antikörperprävalenzstudie, die im Einzugsgebiet einer Landpraxis in Nordbaden durchgeführt wurde. Die Infestation der Zecken mit Borrelien beträgt in dieser Region 20–30%. Durch Testung von Freiwilligen

und Praxisbesuchern wurden ca. 50% der Gesamtbevölkerung des Gebiets erfasst. Alle getesteten Personen wurden anamnestisch hinsichtlich möglicher Manifestationen einer Borreliose befragt, bereits vorhandene Arztunterlagen ausgewertet und eine klinische Untersuchung in der Praxis vorgenommen (15). Seropositive Probanden wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren nachbeobachtet und das Auftreten klinischer Symptome registriert. Berücksichtigt wurden dabei nur objektivierbare Befunde (überwiegend handelte es sich um rezidivierende Oligoarthritis) oder pathognomonische Anamnesen (Erythema migrans), nicht jedoch subjektive Angaben wie Arthralgien, Zeckenstichanamnesen usw. Symptome wurden nur dann als potentiell oder sicher Borreliose-assoziiert angesehen, wenn andere mögliche Ätiologien nicht nachgewiesen werden konnten oder wenn sie pathogenetisch eindeutig waren (Lymphadenitis cutis benigna, Acrodermatitis chronica atrophicans). Die Vergleichskollektive stammten von Blutspendern aus der Region Wilhelmshaven (Serumkollektiv 2, n = 96) sowie von Kindern mit einem Alter zwischen 0,5 und zwei Jahren aus der Kinderklinik der Universität Heidelberg (Serumkollektiv 3, n = 115). Die Kinder stammten überwiegend aus der nordbadischen Region um Heidelberg. Weitere Serumkollektive stammten von Patienten mit einer klinisch definierten Neuroborreliose im Stadium II (N, n = 18) und von Patienten mit einer klinisch definierten Lyme Arthritis (A, n = 12), wobei in dieses Kollektiv nur solche Fälle aufgenommen wurden, bei denen nach klinischen Kriterien die Diagnose als bewiesen angesehen wurde (progrediente Arthritis mit den typischen Charakteristika der Lyme-Arthritis, vorausgegangene oder begleitende pathognomonische Symptome der Lyme-Borreliose wie Erythema migrans, Stadium-II-Neuroborreliose oder Acrodermatitis [16]). Das Serumkollektiv L stammte von Lues-Patienten (L, n = 38, TPHA und FTA abs. reaktiv). Durch Testung im Westernblot wurden zwei Serumkollektive als Westernblot-positiv (WP, n = 20) bzw. Westernblot-negativ (WN, n = 31) charakterisiert. Die Westernblot-positiven Seren stammten von Patienten mit einer Stadium-III-Borreliose. 22 der 31 ausgewählten Westernblot-negativen Seren hatten in den Standardverfahren positive oder grenzwertige Titer erbracht, alle Westernblot-positiven Seren waren in den Standardverfahren ebenfalls positiv. Das Serumkollektiv F (n = 21) umfaßte Seren von Patienten mit einer Borreliose im Frühstadium (Stadien I und II) und setzte sich zusammen aus 16 Seren des Kollektivs N und 5 Seren von Patienten mit einem Erythema migrans.

Ergebnisse

Verteilung von Antikörpertitern in Durchschnittskollektiven und Korrelation zur klinischen Symptomatik

Als Grenzwert für den IgG-IFT (ohne Absorption) wird zurückgehend auf ältere amerikanische Studien zumeist ein Titer von 1:256 verwendet. Gemessen an diesem (potentiellen) Grenzwert haben 19,9% der Probanden des Serumkollektivs 1, 4,1% der Probanden des Serumkollektivs 2 und 0,8% der Kinder zwischen 0,5 und 2 Jahren einen positiven IgG-Antikörpertiter (Abb. 1). Bei den IgM-Antikörpertitern fanden sich nur selten erhöhte Werte (Serumkollektiv 1, 1,4%, Daten nicht gezeigt), wobei der Titer 1:32 als Grenzwert angenommen wurde. Die Auswertung der klinischen Daten der Probanden des Kollektivs 1 ergab einen mit der Höhe des Antikörpertiters positiv korrelierten Anteil von Probanden mit klinischer Symptomatik (Abb. 1 A). Der Anteil der Symptomatischen am Ge-

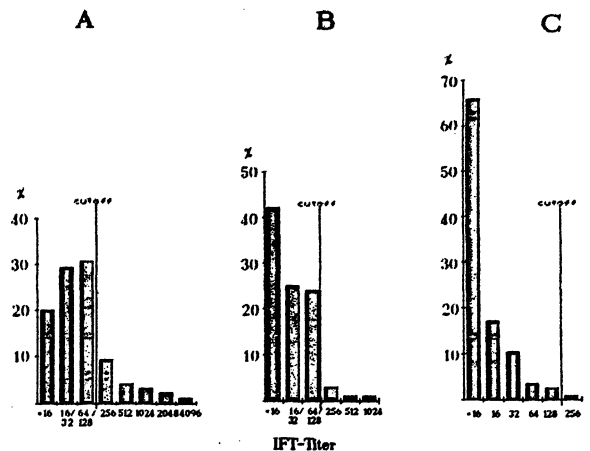


Abb. 2: Sensitivität und Spezifität des IFT in Abhängigkeit vom Cutoff; gefüllte Quadrate = Spezifitätsplot für Serumkollektiv 2; Quadrate = Spezifitätsplot für Serumkollektiv 1; gefüllte Dreiecke = Sensitivitätsplot für Serumkollektiv N; Dreiecke = Sensitivitätsplot für Serumkollektiv A.

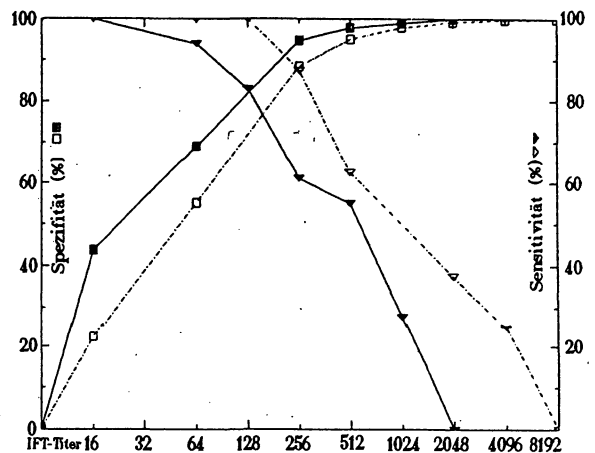


Abb. 2: Sensitivität und Spezifität des IFT in Abhängigkeit vom Cutoff; gefüllte Quadrate = Spezifitätsplot für Serumkollektiv N; Dreiecke = Sensitivitätsplot für Serumkollektiv A.

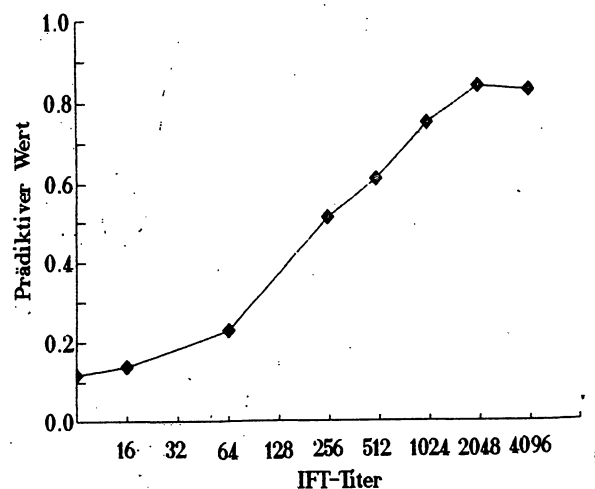


Abb. 3: Prädiktive Werte ($\text{Sens.} \times \text{Präval.} / \text{Sens.} \times \text{Präval.} + [1 - \text{Präval.}] \times [1 - \text{Spez.}]$) des Immunfluoreszenztests im Serumkollektiv 1. Die Prävalenz ist die Häufigkeit einer klinisch manifesten Lyme-Borreliose im Kollektiv. Als Schätzwert für die Prävalenz wurde 0,1 eingesetzt. Dieser Wert entspricht der relativen Häufigkeit der Kranken im Kollektiv abzüglich der relativen Häufigkeit der Kranken bei Titerwerten ≤ 64 (Schätzwert für den Anteil der klinischen Fehldiagnosen).

samtkollektiv betrug 12,5 %. Vorwiegend handelte es sich bei den im Rahmen des Screenings festgestellten klinischen Manifestationen um solche, die dem Spätstadium (Stadium III) der Borreliose zuzuordnen waren, was mit der niedrigen Prävalenz an IgM-Antikörpertitern vereinbar war. Dennoch war die klinische Symptomatik in den meisten Fällen keineswegs pathognomonisch, ein generelles Problem bei der klinischen Festlegung der Diagnose einer Borreliose.

Grenzwertoptimierung.

Die Grenzwertoptimierung wurde anhand von Spezifitätsplots für die Kollektive 1 und 2 sowie Sensitivitätsplots für die Kollektive N und A vorgenommen (Abb. 2). Betrachtet man die Titerverteilung bei den klinisch asymptomatischen Probanden des Serumkollektivs 1, so liegt die 97 %-Perzentile bei einem Titer von 1024; dieser Grenzwert korreliert jedoch mit einer Sensitivität von nur 27,7 % für das Kollektiv N. Da für das Serumkollektiv 2 keine Anamnese bzw. Untersuchungsbefunde zur Verfügung standen, wurde der Spezifitätsberechnung die Annahme zugrunde gelegt, daß alle Getesteten nicht an einer Borreliose erkrankt sind. Die sich daraus ergebende Spezifität ist wahrscheinlich unterschätzt, ihr Wert ist dennoch höher als die aus dem Serumkollektiv 1 ermittelten Spezifitätswerte. Dies weist darauf hin, daß die Spezifität der Tests in Hoch- und Niedrigprävalenzkollektiven unterschiedlich zu bewerten ist. Bei einem reziproken Titer von 256 schneiden sich die meisten Sensitivitäts- und Spezifitätskurven. Dieser Wert ist als Grenzwert geeignet, wenn Sensitivität und Spezifität eine gleich hohe Bedeutung zukommt. Die prädiktiven Werte für verschiedene Grenzwerte wurden anhand der Daten des Serumkollektivs 1 ermittelt (Abb. 3). Bei der Berechnung der prädiktiven Werte für das Serumkollektiv 1 wurden für Prävalenz, Sensitivität und Spezifität als Anzahl der Kranken nicht die ermittelte Gesamtzahl der klinisch symptomatischen zugrunde gelegt, sondern ein Schätzwert. Dabei wurde die Anzahl der klinisch als symptomatisch im Sinne einer Borreliose beurteilten Patienten um eine Anzahl vermindert, die sich aus der relativen Häufigkeit der Diagnose bei serologisch negativen (Titer ≤ 64) Patienten ergab (vgl. Abb. 3). Die so ermittelte Sensitivität stimmte sehr gut mit dem entsprechenden Wert für das Kollektiv A überein (vgl. Abb. 2). Der höchste prädiktive Wert ergab sich mit 0,83 für einen Grenztiter von 1:2048 während

der prädiktive Wert für einen Cutoff-Titer von 1:256 nur 0,45 betrug.

Verwendung unterschiedlicher Borrelienstämme

Die Auswirkung der Verwendung verschiedener Borrelienstämme wurde am Beispiel der Stämme B31 (USA), N34 und NR (Deutschland) evaluiert (Abb. 4). Die mit dem Stamm B31 unter gleichen Bedingungen erzielten Resultate lagen bei einem ausgewählten Serumkollektiv im Mittel um 1,3 Titerstufen niedriger als die mit dem Stamm NR erzielten. Bei Zugrundelegung des Grenzwerts 256 waren 2 Seren nur mit dem Stamm B31 positiv oder grenzwertig, 23 Seren nur mit dem Stamm NR. Im Vergleich mit dem Stamm N34 ergab sich im Mittel kein signifikanter Titerunterschied. 4 Seren waren nur mit dem Stamm N34 grenzwertig positiv. 7 Seren wurden nur mit dem Stamm NR als grenzwertig bzw. positiv diagnostiziert. Auch im EIA sahen wir für den Stamm B31 niedrigere Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Korrelation des Enzymimmuntests mit dem Immunfluoreszenztest

Bei Verwendung des gleichen Borrelienstamms und gleicher Anzuchtbedingungen sowie Festlegung des Grenzwerts anhand des gleichen Kontrollkollektivs ergab sich eine gute Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,85. In 90 % der Fälle waren die Testergebnisse in der Bewertung konkordant. Diskrepanzen fanden sich überwiegend im Bereich um die Grenzwerte (Abb. 5). Hierbei war der ELISA häufiger positiv als der Immunfluoreszenztest. Die Hälfte der diskordanten Befunde betraf Patienten, die wegen einer Borreliose eine Antibiotikatherapie erhalten hatten. Alle hatten IFT-Titer unterhalb des Grenzwerts, aber noch positive EIA-Werte. In der Diagnostik der Borreliose im frühen Stadium zeigten EIA und IFT keine signifikanten Unterschiede (Tab. 1). Die höchste Detektionsrate erreichte man allerdings durch Kombination beider Tests.

Auswirkungen der Absorption mit *T. phagedenis*

Bei insgesamt 96 aus Serumkollektiv 1 ausgewählten Seren wurden die IFT-Titer vor und nach Absorption mit einem *T. phagedenis*-Absorbens (Bios) untersucht. Im Durchschnitt waren die Antikörpertiter eines Negativ- bzw. Grenzwertkollektivs ($n = 100$) im IFT-abs. (B) im Vergleich zum IFT um 1,8 Titerstufen vermindert. Aus diesem

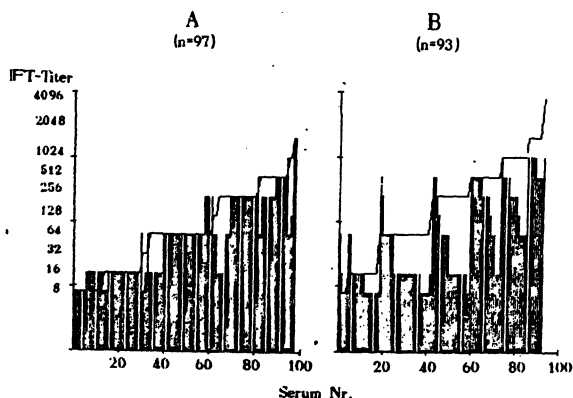


Abb. 4: Vergleich der Stämme N34 (A) und B31 (B) als Antigene im Immunfluoreszenztest. Die mit den betreffenden Antigenen erreichten reziproken Titer der Seren sind als Balken, die Titer des Referenzstammes NR als Linie darüber dargestellt.

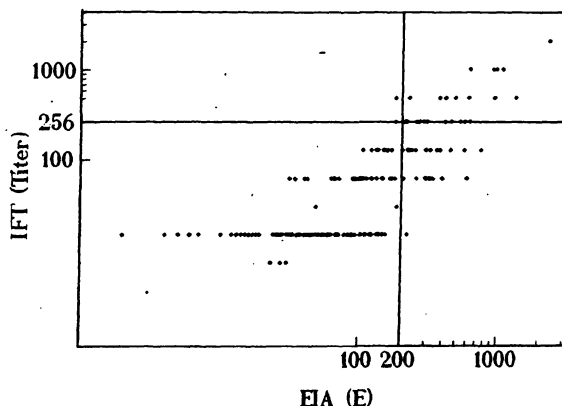


Abb. 5: Korrelation von IFT- und EIA-Werten bei 203 Seren.

Grund wurde der Grenzwert für den IFT-abs. auf 1:64 (Cutoff 2) festgelegt. Unter Berücksichtigung des Cutoff 2 wurden von den zuvor 51 positiven bzw. grenzwertigen Seren 11 negativ; 2 Seren, die zuvor als negativ bewertet worden waren, wurden nach der Absorption grenzwertig (Tab. 1). Von den 11 positiv/negativ-diskordanten Seren stammten 8 von Personen, die keine bzw. nur eine uncharakteristische klinische Symptomatik aufwiesen. Davon wurden 6 Seren im Westernblot getestet, alle waren negativ. Die restlichen 3 Seren stammten von Patienten mit einer klinischen Arthritis und hatten im Westernblot ein charakteristisches Bandenmuster. Die beiden Personen, deren Seren nach Absorption positiv wurden, waren symptomlos und im Westernblot negativ. Der Grenzwert für den EIA-abs. (B) wurde auf gleiche Weise als 155 Standardeinheiten bestimmt. Von 102 Seren, die im EIA-abs. (B) eingesetzt wurden, waren im EIA 60 positiv oder grenzwertig. Von diesen wurden im EIA-abs. (B) 13 negativ, 1 positives Serum war nach Absorption nur noch

grenzwertig. Von den 7 positiv/negativ-diskordanten Seren stammten 2 von Patienten mit klinischer Symptomatik und positivem Westernblot, 1 Patient hatte keine charakteristische Symptomatik und war im Westernblot negativ, bei 4 weiteren war kein Westernblot durchgeführt worden. Von diesen hatte einer eine klinische Symptomatik, die als Stadium-III-Borreliose klassifiziert worden war. Ein zuvor negatives Serum wurde nach Absorption positiv, 5 weitere grenzwertig.

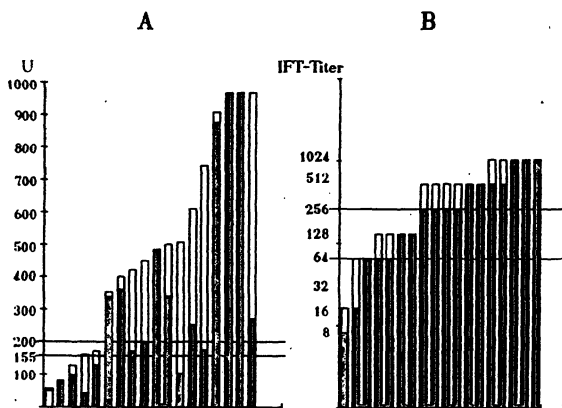


Abb. 6: Seren von Patienten mit einer Stadium-II-Neuroborreliose vor (helle Balken) und nach (schwarze Balken) Absorption im EIA abs. (Bios-Absorbens) (A), bzw. im IFT abs. (Bios-Absorbens) (B). Der Grenzwert im EIA lag bei 200 Standardeinheiten, im EIA abs. bei 155 Standardeinheiten (horizontale Linien).

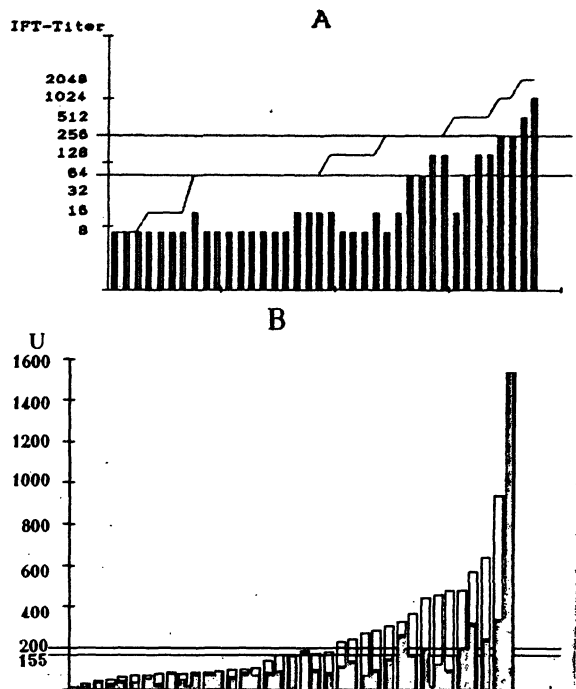


Abb. 7: TPHA-positive Seren (Serumkollektiv L) vor (Linie) und nach (schwarze Balken) Absorption mit T. phagedenis-Absorbens (Bios) im IFT abs. (A) und EIA abs. (B). Die Grenzwerte für die Tests ohne und mit Absorptionsverfahren sind als horizontale Linien eingezeichnet.

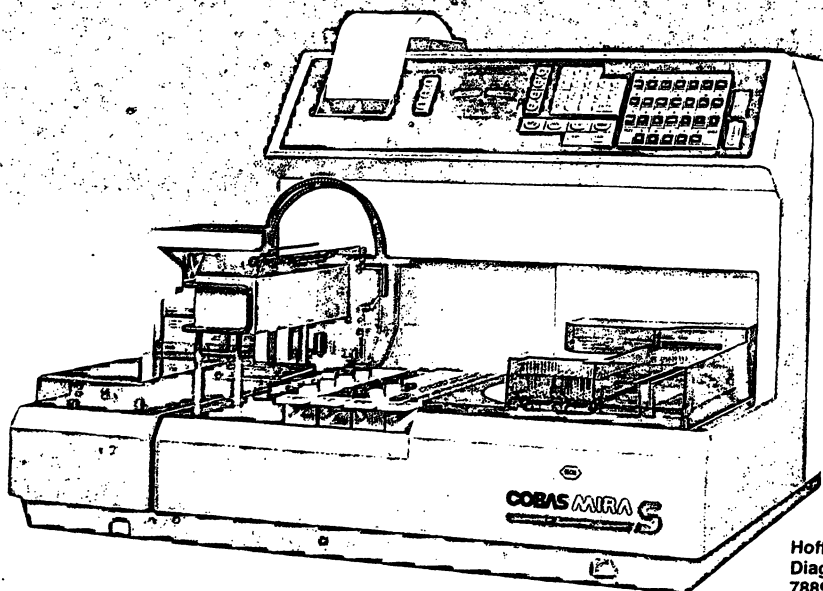
IFT	Serumpanel 1 (n=93)			Neuroborreliose (n=18)			Lues (n=38)		
	pos: 34	grw: 17	neg: 42	pos: 10	grw: 1	neg: 7	pos: 8	grw: 6	neg: 24
A pos	27	4	0	10	1	4	6	2	0
B grw	2	7	2	0	0	2	1	2	0
S neg	5	6	40	0	0	1	1	2	24
EIA	(n=102)			(n=18)			(n=37)		
	pos: 48	grw: 12	neg: 42	pos: 13	grw: 0	neg: 5	pos: 13	grw: 2	neg: 22
A pos	40	0	1	11	0	0	6	0	1
B grw	1	6	5	1	0	0	1	0	2
S neg	7	6	36	1	0	5	6	2	19

Tab. 1: Zusammenfassung der Reaktivität verschiedener Serumkollektive in IFT, IFT abs. (Bios-Absorbens), EIA und EIA abs. (Bios-Absorbens). Diskordante Befunde sind unterlegt.

Unsere **Nr.1**



COBAS MIRA S

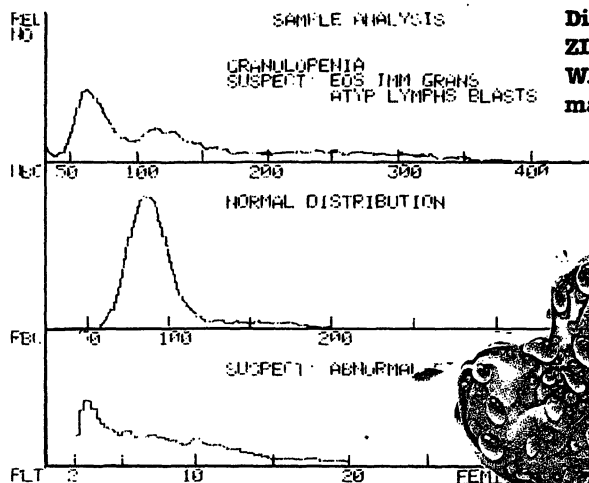
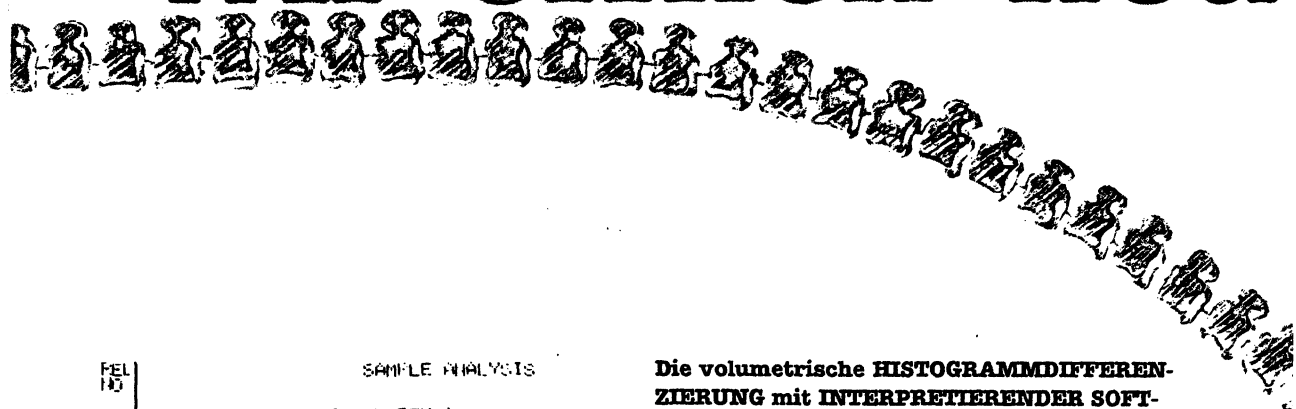


Roche

Hoffmann-La Roche AG
Diagnostica
7889 Grenzach-Wyhlen
Telefon 07624/14-0

Weltweit mehr als 5.000 COBAS MIRA Selektivanalysatoren

Wir öffnen neue



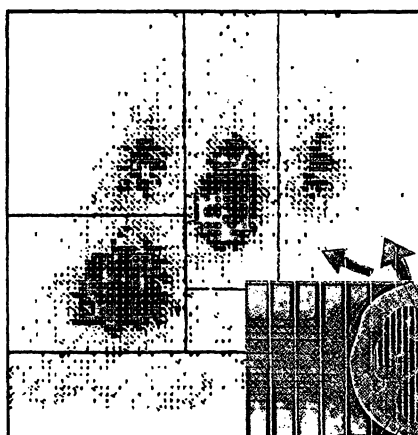
Die volumetrische **HISTOGRAMMDIFFERENZIERUNG** mit **INTERPRETIERENDER SOFTWARE** ist klinisch bewährt und unterstützt Sie maßgeblich bei der Diagnose:

- Durch die Einsortierung der Zellen in bis zu 256 Kanäle erhalten Sie eine maximale Auflösung der Histogramme.
- Damit ermöglicht die interpretierende Software umfangreiche und präzise Warnhinweise, die auf pathologische Zellen hinweisen oder quantitative Verschiebungen im Blutbild aufdecken.
- Mühelose Trennung normaler von pathologischen Blutbildern.



WBC

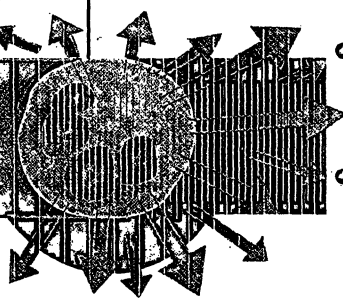
VOLUME



DF 1

Die Zukunft der Differentialblutbilddiagnose liegt in der **EXPLIZITEN MESSUNG DER LEUKOZYTENPOPULATIONEN**:

- Die V.C.S. Technologie analysiert simultan das Volumen, die chemische und physikalische Zusammensetzung und die Oberflächenstreuung der Zellen.
- Das neuartige Reagenziensystem ermöglicht es, die Leukozyten im fast nativen Zustand zu differenzieren.
- Im SCATTERPLOT sind alle fünf explizit gemessenen Leukozytenpopulationen zu sehen. Auch pathologische Zellen sind als Population zu erkennen und werden gewarnt.



weltweit
natürlich mit **COULTER®**

Coulter Electronics GmbH · Gahlingspfad 53 · D-4150 Krefeld 1 · Tel.: 02151/818-0

Hellige Ges.m.b.H. · Herbeckstraße 27 · A-1180 Wien · Tel.: 0043-222-477129

Instrumentengesellschaft AG · Raffelstraße 32 · CH-8045 Zürich · Tel.: 0041-1-4613311

Perspektiven ...

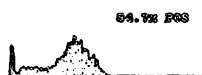
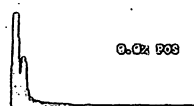
in der Hämatologie & Immunologie

**COULTER® DURCHFLUSSZYTOMETER und
COULTER® MONOKLONALE ANTIKÖRPER**
ermöglichen eine schnelle und zuverlässige
Analyse zur:

- Leukämietypisierung -
besonders zur Differen-
zierung lymphozytärer
Leukämien
- Bestimmung des Immun-
status - z.B. zur AIDS-
Überwachung
- Transplantationsüber-
wachung - mit Retikulo-
zytenzählung
- Tumordiagnostik -
DNA-Analyse
- HLA-Bestimmung



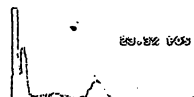
CTL



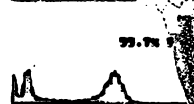
T11..



T4..

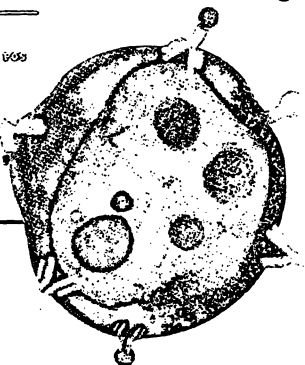


T8..



NORMAL

AIDS



seit 25 Jahren
in Deutschland.



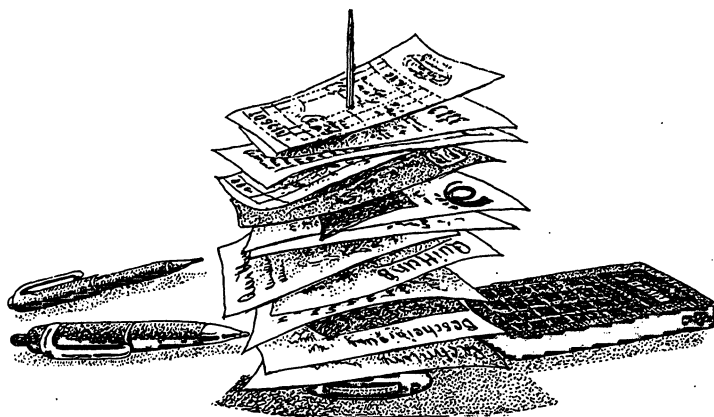
COULTER

Praxishilfen – Wissen, Tips und Service für den Arzt

Kostenstruktur der Arztpraxis

Praxiskosten-Test, Statistik, Steuerprüfung

Von Robert Linden



Dieses Buch soll Sie motivieren, sich einmal die Fragen zu stellen:

Arbeitet meine Praxis wirtschaftlich?

Entspricht mein Praxisgewinn dem Durchschnitt meiner Fachkollegen?

Kann ich durch Rationalisierungen dieses Ergebnis verbessern?

Verlag Kirchheim Mainz

Postfach 2524, 6500 Mainz 1

Die neuen Kostenprozentsätze des Statistischen Bundesamtes sind die Grundlagen für den Praxiskosten-Test, der den Vergleich der eigenen Praxiskosten-Prozentsätze mit denen der Statistik in der passenden Umsatzgruppe ermöglicht. Auch der Steuerprüfer benutzt diese Vergleichswerte, um zeitsparend Prüfungsschwerpunkte zu setzen. Es ist gut, schon vor dem

Prüfer selbst den Test zu machen, um für Abweichungen geeignete Erklärungen und

Argumente bereitzuhalten. Ein ausführliches Kapitel ist der Steuerprüfung in der Arztpraxis gewidmet. Spezielle Erfahrungen, Hinweise und Tips können die Steuerprüfung erleichtern.

Von Robert Linden,
60 Seiten, 24,80 DM,
ISBN 3-87409-169-4

☐	Ich bestelle ... Expl. Linden, Kostenstruktur der Arztpraxis, 24,80 DM, ISBN 3-87409-169-4
Name _____	
Straße _____	
PLZ/Ort _____	
Datum /Unterschrift _____	
Lab. med. 11/90	

Die Auswirkungen der Absorption auf die Seren des Kollektivs N zeigt Abb. 6. Im Test ohne Präabsorption wurden von insgesamt 18 Seren im IFT 11, im EIA 13 Seren als positiv erkannt. Nach Absorption mit dem Bios-Absorbens waren im EIA 12, im Immunfluoreszenztest hingegen 16 Seren positiv bzw. grenzwertig positiv.

Von den im TPHA und FTA abs. positiven Seren (L) reagierten 14 von 38 im IFT positiv oder grenzwertig, 11 im IFT-abs. (B). Im EIA waren aus dem getesteten Serumkollektiv 15 von 37 Seren positiv, im EIA-abs. (B) wurden von diesen 6 negativ. Von den zuvor 22 negativen Seren wurden im EIA-abs. 2 grenzwertig (Abb. 7).

Das Ultrasorbent (BAG, Lich) wurde als alternatives Absorbens im EIA-abs. eingesetzt, da es einen wesentlich höheren Proteingehalt (Sonicat) besitzt als andere kommerzielle Absorbentien. Die quantitativen Auswirkungen der Absorption in einem Negativ- bzw. Grenzwertserumkollektiv (n = 100) machten neben der Ermittlung eines neuen Grenzwerts auch die Verwendung einer anderen Serumverdünnung (1:200 statt 1:500) erforderlich, um im Meßbereich der Methode zu bleiben. Der Grenzwert für den EIA-abs. (US) war bezogen auf den im EIA verwendeten Referenzstandard 34 Einheiten. Untersucht wurde das Serumkollektiv F (Frühstadiumborreliose). Im Testkollektiv sank die diagnostische Sensitivität von 72,7 % (EIA) bzw. 77,2 % (IFT) auf 40,9 % (Tab. 2). Erkannt wurden im EIA abs. (US) vornehmlich Seren von Patienten, bei denen bereits ein prolongierter Verlauf vorlag, der sich im Westernblot in einer Erweiterung des Bandenspektrums manifestierte. Zur Ermittlung der Spezifität wurde ein weiteres Serumkollektiv getestet, das durch den Westernblot als Referenzmethode charakterisiert war (WP, WN, Abb. 8). Im Gegensatz zu den mit dem Bios-Absorbens beobachteten Ergebnissen zeigte sich eine hohe Spezifität des EIA abs. (US). Nur ein Westernblot-negatives Serum war im EIA abs. (US) falsch-positiv. Demgegenüber wurden 9 von 14 Westernblot-positiven Seren erkannt. Unter den 5 nicht als positiv erkannten Proben war ein Serum, das eine ausgeprägte Reaktion mit dem Outer Surface Protein (OSP) A von *B. burgdorferi* aufwies, und das im IFT und EIA hochpositive Werte zeigte, die sich jedoch vollständig absorbieren ließen. Von 6 Seren, die im Westernblot ein qualitativ typisches, jedoch quantitativ nur wenig ausgeprägtes Bandenmuster zeigten, wurde im EIA-abs. (US) keines erkannt. Bei keinem der betroffenen Patienten bestand jedoch zum Zeitpunkt der

EIA ABS (US)		EIA		IFT	
		pos	neg	pos	neg
9	pos	7	2	7	2
13	neg	9	4	10	3
		16	6	17	5

Tab. 2: Reaktivität der Seren des Kollektivs F (Borreliosen im Stadium I und II) im IFT, EIA und EIA abs. (Ultrasorbent). Diskordante Befunde sind unterlegt.

Untersuchung eine klinische Symptomatik. Drei von ihnen waren wegen einer Borreliose vor mehr als einem Jahr behandelt worden und hatten auch in den Standardverfahren nur noch negative Titer. Von 26 Seren des Kollektivs L waren im EIA-abs. (US) 11 positiv, und 3 grenzwertig (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Die Daten zeigen am Beispiel eines Durchschnittskollektivs mit hoher Antikörperprävalenz, daß die gegenwärtig in der Serodiagnostik der Borreliose benutzten Standardverfahren (Immunfluoreszenztest und Enzymimmuntest) nur unbefriedigende Validitätscharakteristika besitzen. Eine hohe Spezifität wird nur bei hohen Cutoff-Werten erreicht, die jedoch nur eine geringe Sensitivität bei der Diagnostik der Frühstadien der Borreliose erlauben. Die mangelnde Spezifität der Standardverfahren führt insbesondere bei der Differentialdiagnostik der Stadium-III-Borreliose zu Schwierigkeiten, bei der zusätzliche diagnostische Kriterien wie der Nachweis von IgM oder einer intrathekalen Antikörperproduktion in der Regel fehlen. Zwar findet man eine mit der Titerhöhe korrelierte zunehmende Häufigkeit klinischer Manifestationen, die sich in den Symptomkomplex der Stadium-III-Borreliose einordnen lassen, andererseits werden aber auch viele asymptomatische Seropositive detektiert. Unabhängig von einer Bewertung dieser Titer als Ausdruck einer latenten Infektion, einer Serumnarbe oder aber auch einer analytisch unspezifischen Reaktion wird dadurch bei gegebene

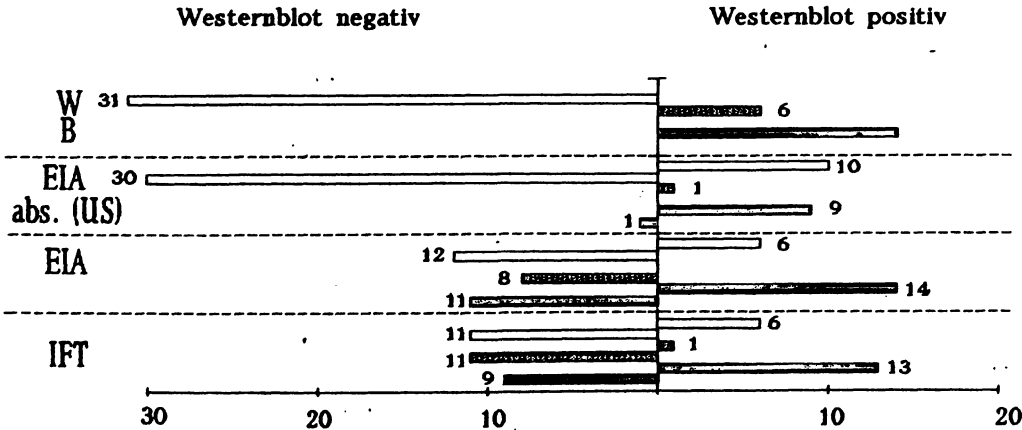


Abb. 8: Reaktion Westernblot-definierter Seren (links WN, rechts WP) im EIA, IFT und EIA abs. (US). Schwarze Balken = positiv; gestrichelte Balken = grenzwertig im EIA oder IFT, bzw. im Westernblot typisches Bandenmuster, aber quantitativ schwach ausgeprägt; helle Balken = negativ

nem Grenzwert die diagnostische Spezifität vermindert. Die sich unter Berücksichtigung der Prävalenz im Endemiegebietkollektiv (Serumkollektiv 1) ergebenden prädiktiven Werte sind geringer als optimistischere Testvalidierungen bisher vermuten ließen (17). Da die klinische Manifestation nur selten ein befriedigendes externes Kriterium für die Diagnose einer Stadium-III-Borreliose darstellt, wurden bei der Ermittlung der prädiktiven Werte Schätzgrößen verwendet, die die mögliche Rate klinischer Fehldiagnosen berücksichtigen. Diese Methode führt eher zu einer Überschätzung der prädiktiven Werte als zu einer Unterschätzung, so daß die ermittelten Zahlen bereits Maximalwerte darstellen. Der Einfluß epidemiologischer Parameter auf die Spezifität der Testverfahren sowie die geographisch unterschiedliche Prävalenz lassen sich in die Routinediagnostik kaum einbringen, da dem Labor die erforderlichen individuellen Informationen meist fehlen. Sinnvoll ist allerdings wegen der in dieser Gruppe höheren Spezifität der Tests die Verwendung eines niedrigeren Grenzwerts für Kinder, wodurch die Sensitivität in der Diagnostik der Frühstadiumborreliosen erhöht werden kann.

Der Immunfluoreszenztest und der ELISA zeigten bei unseren Untersuchungen eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, ihre Sensitivitäts- und Spezifitätscharakteristika unterscheiden sich nicht wesentlich. Auf Unterschiede zwischen den beiden Tests bei der Messung von Antikörperkinetiken nach Therapie wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen (15).

Kein signifikanter Unterschied in den Testergebnissen konnte bei Verwendung von zwei verschiedenen europäischen Isolaten von *Borrelia burgdorferi* als Antigene beobachtet werden, während wir bei Verwendung des Stammes B31 im Durchschnitt niedrigere Titer sahen. In der Frage der Auswirkung der für die verschiedenen Stämme beschriebenen antigenetischen Unterschiede (18) auf die Standardverfahren gibt es unterschiedliche Bewertungen (17, 19). Dies mag damit zusammenhängen, daß auf die Fluoreszenztiter zahlreiche Kultivierungs- und präparationstechnisch bedingte Parameter Einfluß haben, so daß Unterschiede nur bei einer Standardisierung aller sonstigen Durchführungsbedingungen als antigenbedingt angesehen werden können. Unsere Befunde zeigen, daß bei Grenzwertfestlegungen die Art des verwendeten Stammes eine Rolle spielt. Eine klinische Validierung mit einem stammspezifischen Grenzwert wurde allerdings nicht vorgenommen.

Die Verwendung von *Treponema phagedenis* zur Präabsorption der Seren ist in der Literatur umstritten (12, 13). Entscheidend ist der Verwandtschaftsgrad zwischen dem Testantigen und dem zur Absorption verwendeten Antigen. Nicht das Ausmaß des durchschnittlichen Titerverlustes, der durch Festlegung eines neuen Cutoff-Werts ausgeglichen wird, sondern das Verhältnis zwischen spezifischen und kreuzreaktiven Antikörpern, die durch die Absorption nicht erfaßt werden, ist für die Bewertung der Spezifität des Tests mit Absorptionsverfahren maßgebend. Bei unseren Untersuchungen hat sich gezeigt, daß die Beurteilung der Absorption abhängig ist vom verwendeten Absorptionsmedium und darüber hinaus vom Stadium der Erkrankung. Die Absorption mit dem Bios-Absorbens beeinträchtigte die Sensitivität der Diagnostik der frühen Borreliose nicht, konnte aber bei genereller Anwendung auch die Spezifitätscharakteristika nicht verbessern. Lediglich solche Seren, die in den Standardverfahren als positiv bewertet wurden, im anschließend durchgeführten Test mit Präabsorption aber negative Ergebnisse erbrachten, korrelierten befriedigend mit negati-

tiver Klinik bzw. negativem Westernblot. Demgegenüber führte die Absorption mit dem Ultrasorbent zu starken quantitativen Titerverlusten im Durchschnittskollektiv, so daß der neue Grenzwert im EIA abs. (US) nur noch ein Sechstel des ursprünglichen Werts betrug. Gemessen an diesem Cutoff verminderte sich die Sensitivität der IgG-Diagnostik der Frühstadiumborreliosen von über 70% auf 40%, obgleich sogar einige wenige Seren erst nach Absorption als positiv erkannt wurden. Andererseits konnte bei der Diagnostik der Stadium-III-Borreliosen eine wesentliche Verbesserung der Spezifität erreicht werden. Fast alle im EIA abs. (US) positiven Seren korrelierten mit positiver Klinik und positivem Westernblot. Keines der Absorbentien war jedoch in der Lage, die unspezifische Reaktion Lues-positiver Seren vollständig zu eliminieren, so daß auch positive Werte in den Tests mit Absorptionsverfahren in einem Lues-spezifischen Verfahren (TPHA) kontrolliert werden müssen. Dies überraschte beim Ultrasorbent wegen der hohen Spezifität, die sich beim Westernblot-negativen Kollektiv gezeigt hatte. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß hohe unspezifische Titer, die im Westernblot kein Korrelat haben, hauptsächlich durch Antikörper gegen Nicht-Proteinantigene (z. B. Polysaccharidantigene, LPS) hervorgerufen werden, die durch die Absorption evtl. leichter erfaßt werden als die (im Blot nachweisbaren) gegen spezifische Epitope von Proteinantigenen von *B. burgdorferi* gerichteten Antikörper, die man bei der Lues fast immer findet. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß mit zunehmender Verdünnung des Serums nach der Präabsorption, damit abnehmender Konzentration des absorbierenden Antigens, im Sinne eines kompetitiven Gleichgewichts wieder eine verstärkte Bindung an das festphasengekoppelte Antigen eintritt. Testverfahren, die relativ hohe *Treponema*-Antigenkonzentrationen im Inkubationspuffer haben, könnten sich daher als vorteilhaft erweisen.

Gegenwärtig führen wir aufgrund dieser Befunde die Absorption nicht generell durch. IFT und EIA werden als Screeningverfahren eingesetzt. Zusätzlich wird bei Verdacht auf Vorliegen einer Borreliose im Frühstadium der Westernblot durchgeführt, sofern sich bei den Standardverfahren keine eindeutige Konstellation (intrathekale Antikörperproduktion) ergibt. Bei allen übrigen Differentialdiagnosen, die in den Symptomkomplex der Stadium-III-Borreliose einzuordnen sind, werden die in den Standardverfahren positiven Seren anschließend im EIA abs. untersucht, wobei das Ultrasorbent (BAG) wegen seiner erwiesenen Vorteile als Absorptionsmedium eingesetzt wird.

Danksagung

Für die Überlassung der klinischen Daten danken wir den Kolleginnen und Kollegen Dres. Hassler (Serumkollektiv 1), Goronzi und Weyand (Serumkollektiv A) und Wilder-Smith (Serumkollektiv N).

Anschrift für die Verfasser:

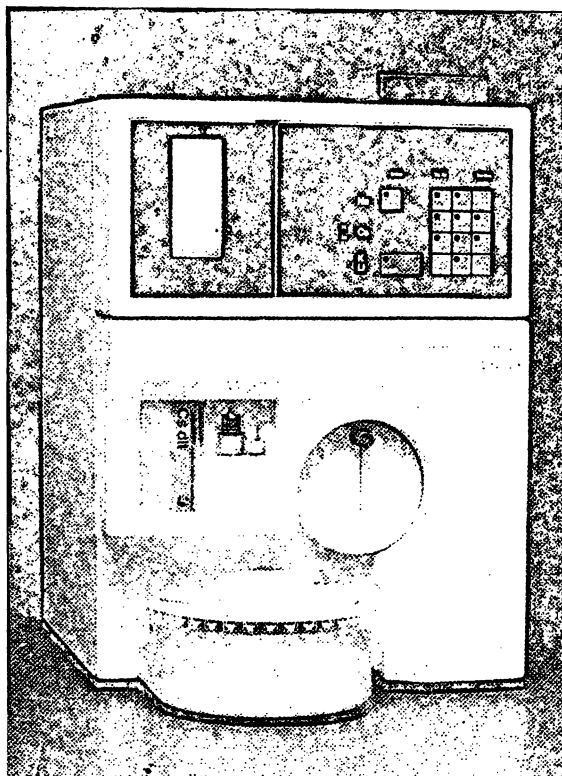
Dr. L. Zöller
Hygiene-Institut der Universität
Im Neuenheimer Feld 324
6900 Heidelberg

Schrifttum:

1. CRAFT, J. E., GRODZICKI, R. L., STEERE, A. C.: Antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *J. Infect. Dis.* 149, 5, 789-795 (1984).
2. MAGNARELLI, L. A., MEEGAN, J. M., ANDERSON, J. F., CHAPPELL, W. A.: Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20, 2, 181-184 (1984).
3. ACKERMANN, R., KABATZKI, J., BOISTEN, H. P., STEERE, A. C., GRODZICKI, R. C., HARTUNG, S., RUNNE, U.: Spirochäten-Ätiologie der Erythema chronicum migrans Krankheit. *DMW* 109, 92-97 (1984).
4. CUTLER, S. J., WRIGHT, D. J. M.: Serodiagnosis of Lyme disease. *Serodiagn. Immunmeth. Inf. Dis.* 2, 1, 4-6 (1988).
5. BARBOUR, A. G.: Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 4, 399-414 (1988).
6. MAUTNER, V. F., GITTERMANN, M., FREITAG, V., SCHNEIDER, E.: Zur Epidemiologie der Borrelia burgdorferi-Infektion; Abhängigkeit der Durchseuchungsrate von den serologischen Bestimmungsverfahren. *Nervenarzt* 61, 94-97 (1990).
7. SATZ, N., ACKERMANN, R., GERN, L., AESCHLIMANN, A., OTT, A., KNOBLAUCH, M.: Zur Epidemiologie der Infektion mit Borrelia burgdorferi - Eine Pilotstudie aus der Gegend von Männedorf. *Schweiz. Med. Wschr.* 118, 422-426 (1988).
8. WILSKÉ, B., MÜNCHHOFF, P., SCHIERZ, G., PRAEC-MURSIC, V., ROGGENDORF, M., ZOULEK, G.: Zur Epidemiologie der Borrelia burgdorferi Infektion - Nachweis von Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi bei Waldarbeitern aus Oberbayern. *Münch. Med. Wschr.* 127, 171-172 (1985).
9. WILSKÉ, B., STEINHUBER, R., BERGMEISTER, H., FINGERLE, V., SCHIERZ, G., PRAEC-MURSIC, V., VANEK, E., LORBEER, B.: Lyme-Borreliose in Süddeutschland. *DMW* 112, 1730-1736 (1987).
10. MAGNARELLI, L. A., ANDERSON, J. F.: Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of class-specific immunoglobulins to Borrelia burgdorferi. *Am. J. Epidemiol.* 127, 4, 818-825 (1988).
11. GRODZICKI, R. L., STEERE, A. C.: Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosing early Lyme disease. *J. Inf. Dis.* 157, 4, 790-797 (1988).
12. WILSKÉ, B., SCHIERZ, G., PRAEC-MURSIC, V., WEBER, K., Pfister, H. W., Einhäupl, K.: Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection* 12, 331-337 (1984).
13. RUSSELL, H., SAMPSON, J. S., SCHMID, G. P., WILKINSON, H. W., PLIKAYTIS, B.: Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Inf. Dis.* 149, 465-470 (1984).
14. ZÖLLER, L., HAUDE, M., HASSLER, D., BURKARD, S., SONNTAG, H. G.: Spontaneous and post-treatment antibody kinetics in late Lyme borreliosis. *Serod. Immunoth. Inf. Dis.* 3, 345-353 (1989).
15. HASSLER, D., ZÖLLER, L., HAUDE, M., HUFNAGEL, H. D., HEINRICH, F., SONNTAG, H. G.: Cefotaxime versus Penicillin in the late stage of Lyme disease - Prospective Randomized therapeutic study. *Infection* 18, 16-20 (1990).
16. WEYAND, C. M., GORONZY, J. J.: Immune responses to Borrelia burgdorferi in patients with reactive arthritis. *Arth. Rheum.* 31, 9, 1057-1064 (1989).
17. HERZER, P.: Lyme-Borreliose. Steinkopff-Verlag Darmstadt, 37 ff. (1989).
18. BARBOUR, A., HEILAND, R. A., HOWE, T. R.: Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: A molecular analysis of North American and European isolates. *J. Inf. Dis.* 152, 3, 478-484 (1985).
19. MAZZONELLI, J., DUFRESNE, Y.: Sérodiagnostic en immunofluorescence de la borréliose de Lyme avec la souche française IP. *Méd. Malad. Infect.* 4, 212-214.
20. ZÖLLER, L., BURKARD, S., SCHÄFER, H.: Validity of Westernblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.*, in press.

IL 943™

Das Referenzflammenphotometer



Die zuverlässigste Methode zur Bestimmung von Na, K und Li

- 100 Proben in der Stunde
- Das ideale Back Up Gerät für Na, K
- Einfachste Li Bestimmung ohne Standardwechsel
- RS 232 Interface
- mit oder ohne Probengeber erhältlich

Wir stellen aus
auf der MEDICA '90,
Halle 4, Stand 4 E 20



Instrumentation Laboratory GmbH

Klausnerring 4, 8011 Kirchheim
Tel.: 0 89 / 90 90 70, Fax: 0 89 / 90 90 7-116