

Borrelia burgdorferi-Antikörpernachweis Vergleich der Testsysteme IFT, ELISA und Western-Blot

Borrelia burgdorferi Antibody-Tests: Comparison of IFT, ELISA and Western-Blot

R. Lange¹, T. Schneider¹, U. Töpel², H. Mäter-Böhm³, A. Beck⁴, H. W. Kölmel¹

¹ Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Rudolf Virchow, Abteilung für Neurologie, Berlin

² Med. Diag. Laboratorium Dr. U. Töpel, Berlin

³ Landesmedizinalluntersuchungsamt Berlin

⁴ Fa. MediRes GmbH, Berlin

Zusammenfassung:

Ein käuflich erhältlicher ELISA mit Ultraschall-Extrakt-Antigen und ein indirekter Immunfluoreszenz-Test (IFA) zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* wurden ausgewertet und mit einem Western-Blot verglichen. In allen drei Test-Systemen wurden Seren einer Berliner Blutbank (n=100), ein Lues-positives Kollektiv (n=100) und Seren von klinisch gesicherten Patienten mit der Europäischen Lyme-Borreliose (n=75) getestet. Die Empfindlichkeit beim spezifischen Nachweis von *B. burgdorferi*-Antikörpern war im ELISA und im Western-Blot vergleichbar, im verwendeten IFA dagegen geringer.

Schlüsselwörter:

Borrelia burgdorferi – Antikörpernachweis – Methodenvergleich – ELISA – IFA – Western-Blot

Summary:

A commercially available sonic extract enzyme linked immuno assay (ELISA) and an indirect immunofluorescence assay (IFA) for detecting serum IgG and IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* were evaluated and compared with a Western blot. For this purpose sera obtained from a Berlin blood bank (n=100), a Lues positive collective (n=100) and sera from clinical confirmed European Lyme borreliose patients (n=75) were tested in all three test systems. The sensitivity for detecting specifically by *B. burgdorferi* antibodies was comparable in the ELISA and Western Blot but less in the used IFA.

Keywords:

Borrelia burgdorferi – antibody detection – comparison of test systems – ELISA – IFA – Western blot

Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist die in Europa am häufigsten von Arthropoden übertragene Erkrankung (9). *Borrelia burgdorferi*, eine Spirochäte, wird von Schildkröten der Gattung *Ixodes* vom Tier auf den Menschen übertragen (4). Wie die Syphilis ist die Borreliose in der Lage, die Krankheitsbilder vieler anderer Erkrankungen zu imitieren, was die Differentialdiagnose erschwert (1). Der Kliniker wünscht sich deshalb serologische Methoden, die es ermöglichen, früh und möglichst spezifisch Borrelien-Antikörper der Klassen IgM und IgG im Serum der Patienten nachzuweisen. Zuverlässige Testverfahren würden so auch eine Beurteilung der Fälle zulassen, die sich nicht in das klinische Schema der Borreliose einfügen lassen. Heute werden bevorzugt Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) und indirekte Immunfluoreszenzmethoden (IFT) zur Bestimmung von spezifischen Antikörpern eingesetzt. Es gibt keine standardisierten Richtwerte für die Durchführung und Bewertung der in vielen Laboratorien eingesetzten Testsysteme (2, 3). Die Antigenaufbereitung und die "Cut-off"-Werte variieren von Firma zu Firma bzw. von Labor zu Labor. Deshalb haben wir eine Untersuchung durchgeführt, die zwei konventionelle Systeme mit einem Western-Blot-Verfahren vergleicht.

Material und Methodik

Es wurden 100 Probanden mit serologisch bestätigter *Treponema pallidum*-Infektion sowie Serumproben von 100 Probanden ohne klinischen und anamnestischen Anhalt und 50 Patienten

mit klinisch gesicherter Borreliose auf die Anwesenheit von *B. burgdorferi*-Antikörpern untersucht.

Als Standardtestmethoden wurden ein Immunfluoreszenztest und ein ELISA-System der Fa. Virimmun, Frankfurt, nach den Richtlinien des Herstellers eingesetzt.

Für den Western-Blot-Test wurde eine 7 Tage in BSK-II Medium gewachsene *B. burgdorferi*-Kultur mit einer Dichte von 10^8 Zellen/ml als Antigen eingesetzt. Für alle weiteren Präparations-schritte wurden die Spirochäten bei $10000 \times g$ 10 min abzentrifugiert und in PBS ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$ pH 7.2 (Fa. Gibco) dreimal gewaschen.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurde das gewonnene Antigenmaterial auf Eis 3×1 min lang ultraschallt und die Prozedur im Dunkelfeld bei 250facher Vergrößerung kontrolliert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des hergestellten Ultrasonikats nach der von Rylatt und Parish modifizierten Bradfordmethode photometrisch bestimmt (8). Für die Herstellung einer Blotfolie wurden $30 \mu g$ Protein mit Probenpuffer (62,5 mmol/l Tris, 2% SDS, 2% Mercaptoethanol, 10% Glycerin, Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, 5 min gekocht und in einem 10%igen Polyacrylamid-Gel 1 h mit 30 mA elektrophoretisch (Elektrodenpuffer: 25 mmol/l Tris, 192 mmol/l Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) aufgetrennt (Hoefer scientific instruments, San Francisco; SE 250 Minigel 8×7 cm). Die Gele wurden anschließend 15 min in Blotpuffer (48 mmol/l Tris, 39 mmol/l Glycin, 0,375% (g/l) SDS, 20% Methanol) equilibriert und durch ein Halb-Trocken-Blotverfahren (PEGASUS, Fa. Phase, Mölln) mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h elektrophoretisch an Nitrozellulose gebunden und die freibleibenden Bindungsstellen mit einem 1% BSA, 1% Ovalbumin, 0,05% Tween 20 PBS (Fa. Gibco) Gemisch bei $4^\circ C$ 12 h auf dem Schüttler blockiert. Zur Kontrolle der elektrophoretischen Trennung und des Halb-Trocken-Transfers der Proteine auf Nitrozellulose (Schleicher und Schüll BA 085, $0,45 \mu m$) wurde der SDS-70L Proteinstandard von Sigma eingesetzt. Jede hergestellte Folie

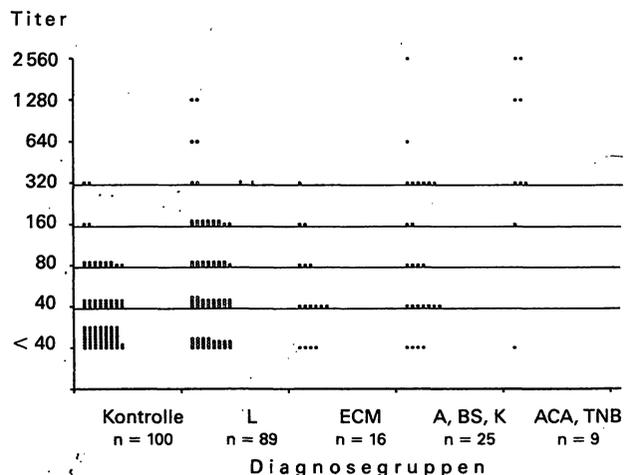


Abb. 1: Verteilung der IgG-IFT-Titer in Abhängigkeit von *Borrelia*-stadium A = Arthritis-Arthralgie, ACA = Akrodermatitis chronica atrophicans, BS = Bannwarth-Syndrom, ECM = Erythema chronicum migrans, K = Karditis, L = Lues; TNB = Tertiäre Neuroborreliose

MW in kDa

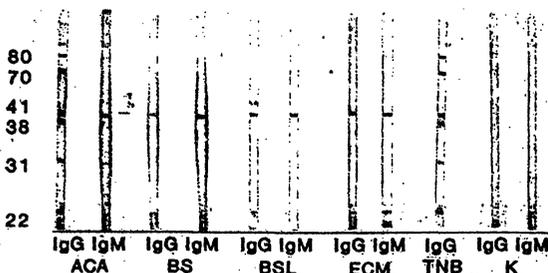


Abb. 2: *B. burgdorferi*-spezifische Antikörper
 ACA = Akrodermatitis chronica atrophicans, BS(L) = Bannwarth-Syndrom (Liquor), ECM = Erythema chronicum migrans, TNB = Tertiäre Neuroborreliose, K = negative Kontrolle

wurde vor Gebrauch mit einem positiven und negativen Kontrollserum auf die Anwesenheit aller für die Diagnostik relevanten Proteine getestet.

Vor der Inkubation mit Patientenmaterial wurden die Folien 3 x 10 min mit PBS-Tween (0,05 %) gewaschen und in 3 mm breite Teststreifen geschnitten. Das Patientenserum wurde 1:100 in Verdünnungspuffer (PBS, 0,25 % BSA, 0,05 % Tween 20) aufgenommen. Liquor wurde entsprechend der IgG-Konzentration des Serums eingesetzt. Die Proben inkubierten über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Nach 3 x 10 min Waschen mit PBS-Tween (0,05 %) inkubierten die gegen menschliches IgG bzw. IgM gerichteten, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (Fa. Dianova IgG 1:5000; IgM 1:7000) 1,5 h bei Raumtemperatur. Die Antikörperreaktion wurde nach 3 x Waschen durch die Zugabe von Naphtol (Sigma: N-5000), Fast Red (Fa. Sigma: F-1500) Substrat sichtbar gemacht.

Als IgG-positiv wurden die Seren bewertet, die mindestens 2 von folgenden Banden (41, 38, 30, 22 und 18 kDa) erkannten. Eine ausgeprägte 41 kDa oder mehrere Proteinbanden im IgM-Western-Blot wurden als positiv interpretiert (vgl. Abb. 2).

Ergebnisse

Im Kontrollkollektiv (n = 100) reagierten 6 im ELISA, 4 im IFT und keiner im Western-Blot positiv. Mit dem ELISA-System wur-

Tab. 1: Spezifität und Sensitivität der Testsysteme IFT Grenztiter: IgG ≥ 320, IgM ≥ 80; IFT Grauzonentiter: IgG = 80-160, IgM = 40

Test	Kontrollkollektiv (n = 100) Werte in %			Lueskollektiv Werte in %			Borreliosekollektiv (n = 50) Werte in %		
	IFT	ELISA	WB	IFT	ELISA	WB	IFT	ELISA	WB
positiv	4	6	0	10,1	38,2	8	36	76	96
Grauzone	24	5	4	39,3	18	15	42	6	2
negativ	72	89	97	50,6	43,8	77	22	18	2

Tab. 2: IgG- und IgM-Nachweis im Borreliosekollektiv (n = 50)
 Stadium I: Erythema chronicum migrans; Stadium II: Bannwarth-Syndrom, Karditis, Arthritis; Stadium III: Akrodermatitis chronica atrophicans, Tertiäre Neuroborreliose

Ig-Klassen	Stadium I (n = 16)		Stadium II (n = 25)				Stadium III (n = 9)					
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM		
Befund	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg		
IFT	1	15	0	16	8	17	4	21	7	2	2	7
ELISA	9	7	4	12	17	8	7	18	8	1	2	7
Western-Blot	15	1	10	6	24	1	14	11	9	0	4	5

den 38 der Borreliosepatienten (n = 50) im IFT 18 (Grenztiter IgG = 1:160), und im Western-Blot 48 als IgG-positiv erkannt. Von den Lues-positiven Seren zeigten 34 im ELISA, 9 im IFT und 8 im Western Blot positive Reaktionen (siehe Tabelle 1). Betrachtet man die einzelnen Stadien der Lyme-Borreliose, so stellt man fest, daß mit der Fortdauer der Erkrankung die Serodiagnose sicherer wird (vgl. Tab. 2 und Abb. 1).

Diskussion

Die Sicherung der Diagnose Lyme-Borreliose stützt sich auf den Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum und/oder Liquor gegen *Borrelia burgdorferi* (1). Bei klinisch gesunden Probanden ist der Anteil serologisch falsch positiver Ergebnisse in allen Testsystemen gering (vgl. Tab. 1). Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, sollte eine Luesserologie zusätzlich durchgeführt werden (6, 7). Im Gegensatz zu Grellner und Mitarbeitern fanden wir keine Borrelien-spezifische Banden im Western-Blot, die nicht auch von Lues-positiven Seren erkannt werden (5). Mit dem ELISA und Western-Blot wird der größte Teil der klinisch gesicherten Borreliosen erkannt. Die serologisch negativen Patienten befinden sich vorwiegend in den Frühstadien der Erkrankung (siehe Tab. 2).

Die frühe serologische Erkennung erleichtert eine erfolgreiche Therapie der Lyme-Borreliose. Deshalb ist es erforderlich, sensitive Testmethoden zum Screenen einzusetzen. Dazu eignen sich wegen ihrer einfachen und schnellen Handhabung ELISA-Testsysteme. Bei klinisch und serologisch abweichenden Befunden sollte der sensitivere Western-Blot von mit diesem System vertrauten Fachleuten durchgeführt und beurteilt werden (6).

Schrifttum:

1. ACKERMANN, R., GOLLMER, E., REHSE-KÜPPER, B.: Progressive Borrelien-Enzephalomyelitis. Dtsch. med. Wschr. 26, 1039-1042 (1985).
2. BARBOUR, A. G.: Laboratory aspects of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. Rev. 1, 399-414 (1988).
3. BARBOUR, A. G.: The diagnosis of Lyme disease: rewards and perils. Ann. Int. Med. 110, 501-502 (1989).
4. BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENACH, J. L., GRUNWALDT, E., DAVIS, J. P.: Lyme disease - a tick borne spirochetosis? Science 216, 1317-1319 (1982).
5. GRELLNER, W., ERBGUTH, F., BRADE, V.: Serodiagnostik bei Lyme-Borreliose: Antikörper- und -spezifität im IFT und Western-Blot. Immun. Infekt. 17, 189-194 (1989).
6. 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. Infect. Dis. 157, 790-797 (1988).
7. MAGNARELLI, L. A., ANDERSON, J. F., JOHNSON, R. C.: Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. J. Infect. Dis. 156, 183-188 (1987).
8. RYLATT, D. B., PARISH, C. R.: Protein determination on an automatic Spectrometer. Anal. Biochem. 121, 213-214 (1982).
9. SCHNEIDER, T., LANGE, R.: Durch Zecken übertragbare Infektionserkrankungen. Fortschr. Med. 107, 489-492 (1989).

Danksagung

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Durchführung der IFT- und ELISA-Untersuchungen danken wir Frau S. Troppmann. Diese Studie wurde von der BERLIN-Forschung, ein Förderungsprogramm für junge Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler der Freien Universität Berlin und der Fa. Virimmun, Frankfurt, unterstützt.

Anschriften der Verfasser:

Dipl. Biol. R. Lange
 Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Rudolf Virchow
 Abteilung Neurologie, Spandauer-Damm 130, 1000 Berlin 19

Dr. T. Schneider
 Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Rudolf Virchow
 Abteilung Neurologie, Spandauer Damm 130, 1000 Berlin 19

Dr. U. Töpel
 Med. Diag. Laboratorium, Dr. U. Töpel, Brabanter Straße 18,
 1000 Berlin 31

Dr. H. Mäter-Böhm
 Landesmedizinaluntersuchungsamt Berlin,
 Rubensstraße 111, 1000 Berlin 41

Dr. A. Beck
 Fa. MediRes GmbH,
 Gütergotzer Straße 55, 1000 Berlin 37

Prof. Dr. H. W. Kölmel
 Freie Universität Berlin, Universitätsklinikum Rudolf Virchow
 Abteilung Neurologie, Spandauer Damm 130, 1000 Berlin 19 □