

Wertigkeit des Hämagglutinations-Tests, Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptions-Tests und ELISA in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose

Value of the Borrelia hemagglutination test, the fluorescent Borrelia antibody absorption test and ELISA in the serodiagnosis of Lyme borreliosis

M. Moskophidis, Birgit Luther

Zusammenfassung

Als serologische Tests haben sich in der Diagnostik der Lyme-Borreliose der Borrelia-Hämagglutinations (BO-HA)-Test, der Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptions (FBA-Abs)-Test und der ELISA bewährt. Spezifität und Sensitivität dieser Tests in der Serodiagnostik der Borrelia burgdorferi-Infektion wurden anhand von Seren von Patienten mit klinisch definierten Manifestationen der Lyme-Borreliose bewertet. Eine hohe Spezifität bei niedriger Sensitivität insbesondere im frühen Stadium der Infektion kennzeichneten den BO-HA-Test. Der FBA-Abs-Test zeigte eine hohe Spezifität und Sensitivität in der Serodiagnostik der manifesten Lyme-Borreliose. Der indirekte Borrelia-IgG- und IgM-ELISA, bei dem als Antigen ein Octylglucosid-Extrakt des B. burgdorferi-Isolates PKo diente, war hinsichtlich Spezifität und Sensitivität dem Immunfluoreszenztest vergleichbar. Kreuzreagierende Antikörper im ELISA wurden durch ein Treponema phagedenis-Ultrasonikat präabsorbiert. Der Borrelia-IgM-ELISA wurde nach vorheriger IgG-Immunpräzipitation durchgeführt.

Schlüsselwörter

Lyme-Borreliose – Borrelia-Hämagglutination – Immunfluoreszenz – ELISA

Anschriften der Autoren:

Abt. für Immunologie, Virologie und Impfwesen, Medizinaluntersuchungsanstalt, Hygienisches Institut, Hamburg

Korrespondenz-Adresse:

PD Dr. Matthäus Moskophidis, Dr. Birgit Luther, Hygienisches Institut, Abt. Immunologie, Virologie und Impfwesen, Marckmannstr. 129 a, 20539 Hamburg

Summary

Borrelia hemagglutination (BO-HA) test, fluorescent borrelial antibody-absorption (FBA-Abs) test and ELISA have proved as serological tests in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Using sera from patients with clinical defined manifestations of Lyme borreliosis specificity and sensitivity of these tests in the serodiagnosis of B. burgdorferi infection were evaluated. A high specificity but a low sensitivity particularly in the early stage of infection characterized the BO-HA test. The FBA-Abs test showed a high specificity and sensitivity in the serodiagnosis of manifest Lyme borreliosis. The indirect Borrelia IgG and IgM ELISA were performed using an octylglucoside extract of B. burgdorferi isolate PKo as antigen. The Borrelia ELISA was comparable in specificity and sensitivity to the immunofluorescence test. Cross-reacting antibodies in ELISA were pre-absorbed using a Treponema phagedenis ultrasonicate. Borrelia IgM ELISA was performed after IgG immunoprecipitation.

Key words

Lyme borreliosis – Borrelia hemagglutination – immunofluorescence – ELISA

Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist eine weltweit hauptsächlich durch Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen, die durch die Spirochäte Borrelia burgdorferi verursacht wird [1]. Beim Menschen ist die Lyme-Borreliose durch vielfältige Manifestationen, darunter Erscheinungen an der Haut (Erythema chronicum migrans, Lymphadenitis benigna cutis, Acrodermatitis chronica atrophicans), am Nervensystem, am Herzen, und an den Gelenken charakterisiert [2].

Der Erreger der Lyme-Borreliose ist zwar auf komplexen künstlichen Nährmedien [3] anzüchtbar, seine Anzucht aus Patientenumaterial (Hautbiopsie, Blut, Liquor) gelingt jedoch eher selten [4]. Der direkte Nachweis von Borrelien ist im Biopsiematerial aus Hautläsionen von Patienten mit Erythema chronicum migrans oder Acrodermatitis chronica atrophicans sowie aus der Synovia von Patienten mit Lyme-Arthritis mit Hilfe der Silberfärbung oder der Immunfluoreszenz prinzipiell möglich [5, 6]. Der Erfolg dieses diagnostischen Verfahrens ist allerdings durch die häufig nur geringe Anzahl von Borrelien im Biopsiematerial begrenzt. Schließlich läßt sich mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Borrelien-DNS in Liquor, Urin, Synovialflüssigkeit und Hautbiopsien von Patienten mit Lyme-Borreliose nachweisen [7, 8, 9]. Negative Ergebnisse in der PCR schließen jedoch eine B. burgdorferi-Infektion nicht aus. In der Diagnostik der Lyme-Borreliose steht wegen der Schwierigkeit der kulturellen Anzucht oder des direkten Nachweises des Erregers daher der Antikörpernachweis im Vordergrund.

Als serologische Tests haben sich in der Diagnostik der Lyme-Borreliose der Borrelia-Hämagglutinations-, der Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptions-Test und der ELISA bewährt. In der vorliegenden Arbeit wird eine kritische Bewertung dieser Tests bei der Diagnostik der Lyme-Borreliose anhand von Seren von klinisch definierten Patienten mit Erythema chronicum migrans, Lymphadenitis benigna cutis, Lyme-Carditis, Neuroborreliose, Lyme-Arthritis und Acrodermatitis chronica atrophicans vorgenommen. Spezifität und Sensitivität dieser Tests in der Serodiagnostik der verschiedenen klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose werden diskutiert.

Material und Methoden

Patientenmaterial

Sämtliche Serumproben für die Borreliose-Diagnostik stammten von unbehandelten Patienten, bei

denen die einschendenden Ärzte (Dermatologen, Neurologen) aufgrund der klinischen Symptome oder einer Zeckenstich-Anamnese eine Lyme-Borreliose-Erkrankung vermuteten. Die Ergebnisauswertung erfolgte nach folgenden Krankheitsgruppen, die klinisch diagnostiziert wurden:

1. Erythema chronicum migrans mit typischem flächenhaftem Erythem nach Zeckenstich,
2. Lymphadenitis benigna cutis mit rötlich lividen Knoten am Ohr läppchen oder an der Mamille,
3. lymphozytäre Meningoradiculitis mit radikulären Schmerzen, Parästhesien, Paresen und lymphozytärer Pleozytose im Liquor cerebrospinalis,
4. Carditis mit Erregungsleitungsstörung (atrioventrikulärer Block),
5. Arthritis mit Gelenkschwellung und Arthralgie,
6. Acrodermatitis chronica atrophicans mit atrophischen, pergamentpapierartigen Hautveränderungen,
7. asymptomatisch jedoch mit einer länger zurückliegenden Zeckenstich-Anamnese,
8. Hauteffloreszenzen unklarer Genese zum Ausbruch einer Lyme-Borreliose-Erkrankung.

Als Kontrollen dienten Seren gesunder Erwachsener. Zur Ermittlung von Kreuzreaktionen kamen Seren von Patienten mit Primärsyphilis (syphilitischer Primäraffekt, regionäre Lymphadenitis) und Sekundärsyphilis (makulopapulöses Exanthem, Palmar- und/oder Plantarläsionen) zum Einsatz. Eine Syphilis-Erkrankung wurde zusätzlich serologisch abgesichert.

Anzucht von Borrelia burgdorferi

Das verwendete B. burgdorferi-Isolat war der europäische Stamm PKa, der ursprünglich aus dem Liquor cerebrospinalis von einem Patienten mit Bannwarth-Syndrom isoliert wurde [10]. Der Stamm wurde bei -70°C im modifizierten Barbour-Stoener-Kelly (BKS)-Medium [3] gehalten. Die Anzucht erfolgte bei 35°C für 6–8 Tage im BKS-Medium. Borrelien im Wachstumsmedium wurden durch Zentrifugation bei $30.000 \times g$ pelletiert, dreimal in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS: 2 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 147 mM NaCl), pH 7,2, gewaschen und erneut pelletiert. Borrelien-Pellets dienten als Ausgangsmaterial für den indirekten Immunfluoreszenztest. Die Borrelienzahl wurde mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie ermittelt.

Abkürzungen:

ACA	= Acrodermatitis chronica atrophicans
BO-HA	= Borrelia-Hämagglutinations-Test
ECM	= Erythema chronicum migrans
FBA-Abs-Test	= Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper – Absorptions-Test
LA	= Lyme Arthritis
LBC	= Lymphadenitis benigna cutis
LMR	= lymphozytäre Meningoradiculitis

Borrelia-Hämagglutinations-Test

Der *Borrelia burgdorferi*-Hämagglutinationstest, bei dem als Antigene die Außenmembranproteine einiger europäischer und amerikanischer *B. burgdorferi*-Stämme verwandt werden, wurde nach Anweisung des Herstellers (Biologische Arbeitsgemeinschaft, Lich) quantitativ, beginnend mit der Serumverdünnung von 1:10, durchgeführt.

Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptions-Test

Etwa 20 µl einer Borreliensuspension mit einer Keimzahl von 10^7 /ml PBS wurden pro Vertiefung auf Objektträger (Bio-Merieux, Nürtingen) aufgebracht und bei 22 °C getrocknet. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:5 mit einem T. phagedenis-Ultrasonikat (Proteingehalt 3 mg/ml PBS; Biologische Arbeitsgemeinschaft) verdünnt und 30 min bei 37 °C (Wasserbad) inkubiert. Nach Abzentrifugation des Ultrasonikats 10 min bei $2.000 \times g$ wurde der Überstand in PBS von 1:10 bis 1:5.120 verdünnt und jeweils 25 µl auf die Borrelien-beschichteten Objektträger aufgetropft und 30 min bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach Waschen der Objektträger mit PBS wurden Borrelien-gebundene Antikörper durch eine zweite Inkubation mit einem FITC-markierten Anti-Humanimmunglobulin-Serum von der Ziege (Bio-Merieux) in der Gebrauchsverdünnung von 1:50 nachgewiesen. Zur Ermittlung kreuzreagierender Antikörper in Patientenseren wurde der Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Test ohne vorherige Absorption mit T. phagedenis-Ultrasonikat parallel durchgeführt.

Fraktionierter IgM-FBA-Abs-Test

Zur quantitativen Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* in Patientenseren wurde der fraktionierte IgM-FBA-Abs-Test durchgeführt. Auftrennung des Serum-IgM's vom IgG erfolgte durch Gelfiltration eines 0,7 ml aktiven Patientenserns an einer $1,5 \times 14$ cm Sephacryl S-300-Säule (Pharmacia, Heidelberg). Als Elutionsmittel diente PBS. Fraktionen von 1,3 ml wurden gesammelt und die Extinktion bei 280 nm gemessen. Jeweils vier Fraktionen um den IgM-Peak wurden vereint. IgM-spezifische Antikörper wurden mit Hilfe des FBA-Abs-Testes unter Verwendung eines µ-kettenspezifischen, FITC-markierten Anti-Human-IgM-Serns von der Ziege (Bio-Merieux, Nürtingen) in der Verdünnung von 1:30 quantitativ bestimmt. Bei der Ermittlung des Titors wurde ein Verdünnungseffekt des Serns von 1:5 berücksichtigt.

B. burgdorferi IgG- und IgM-ELISA

Zur quantitativen IgG- und IgM-Antikörperbestimmung in Sern von Patienten mit Lyme-Borreliose wurde eine Modifikation des indirekten Enzygnost Borreliosis-Enzymimmunoassays (Behringwerke, Marburg) verwendet. Als Festphase diente ein mit Octylglucosid extrahiertes Antigengemisch des europäischen *B. burgdorferi*-Patientenisolates PKo [11]. Als Probenverdünnungspuffer diente Tris/HCl-Puffer, pH 8,1, der mit einem T. phagedenis-Ultrasonikat versetzt wurde. Bei der IgM-Antikörperbestimmung wurden die Patientenseren 1:20 im Probenpuffer vorverdünnt und dann zu gleichen Teilen mit einem Anti-Human-IgG (γ-kettenspezifisch)-Hyperimmunserum vom Schaf (Behringwerke) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das IgG-Immunpräzipitat bei $6.000 \times g$ für 10 min abzentrifugiert und der Überstand (Serumverdünnung 1:40) für die quantitative IgM-Antikörperbestimmung eingesetzt. Als Waschlösung zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wurde 0,05 % Tween 20-PBS, pH 7,2, verwendet. Jeweils 200 µl Serumverdünnungen im Probenpuffer von 1:200, 1:800 usw. für die IgG-Antikörperbestimmung und von 1:40, 1:80 usw. für die IgM-Antikörperbestimmung wurden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Borrelien-gebundenes IgG oder IgM wurde durch Zusatz von 100 µl eines Peroxidase-konjugierten Anti-Human-IgG-Serns vom Kaninchen (γ-kettenspezifisch) oder eines Anti-Human-IgM-Serns von der Ziege (µ-kettenspezifisch) in PBS, pH 7,2, für 30 min bei 37 °C markiert. Schließlich wurde durch Zusatz von 100 µl Substratlösung (0,5 mg Tetramethylbenzidinhydrochlorid/ml 0,1 M Natriumacetat/Citronensäure-Puffer, pH 6,0; 0,01 % H_2O_2) für 30 min in Dunkelheit die Enzymreaktion ausgeführt und der Reaktionsablauf dann mit 100 µl einer 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Die optische Dichte wurde mit einem Multiscan (Titertek) bei 450 nm gegen 200 µl 0,5 M Schwefelsäure gemessen. Als Endtiter wurde die jeweils höchste Serumverdünnung definiert, die über dem Mittelwert von fünf Negativkontrollen der jeweiligen Probenverdünnung lag. Für die quantitative IgG-Antikörperbestimmung im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Verdacht auf Neuroborreliose wurden die Liquores 1:5, 1:10 usw. im Probenpuffer verdünnt.

Treponema pallidum-Hämagglutinationsassay (TPHA)

Der TPHA-Test wurde nach Angaben des Herstellers (Mast-Diagnostika, Reinfeld) durchgeführt.

Quantitative Bestimmung vom Gesamt-IgG

Die quantitative Bestimmung vom Gesamt-IgG im Serum und Liquor cerebrospinalis erfolgte mit Hilfe der radialen Immundiffusion auf Partigenplatten (Behringwerke).

Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die mittleren reziproken B. burgdorferi-Antikörpertiter der Kontrollgruppen in den Borrelien-Tests und im TPHA zusammengefaßt. Bei den gesunden Erwachsenen (Gruppe 1) fielen alle Borrelien-Tests negativ aus. In den Seren der Kontrollgruppe 2 sowie der Patienten mit Primär- und Sekundärsyphilis (Gruppe 3 und 4) wurde eine hohe Antikörper-Kreuzreaktivität im FBA-Test festgestellt, die nach Präabsorption der Seren mit einem T. phagedenis-Ultrasonikat nicht mehr nachweisbar war. Trotz der hohen kreuzreagierenden Antikörpertiter der Syphilisseren im FBA-Test wurde im Borrelia-IgG-ELISA nur eine geringe Kreuzreaktivität und zwar ausschließlich bei den hochtitrigen Seren von Patienten mit Sekundärsyphilis festgestellt. Auffallend ist, daß alle Patientenseren der Kontrollgruppen im BO-HA-Test und im Borrelia-IgM-ELISA negativ waren.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen von Patienten, bei denen aufgrund der klinischen Symptome oder einer Zeckenstich-Anamnese eine Lyme-Borreliose vermutet wurde, dargestellt. Der BO-HA-Test zeigte bei fünf Seren von Patienten mit ECM aber auch bei einem Serum von einem Patienten mit NB ein negatives Ergebnis. Hohe Antikörpertiter im BO-HA-Test wurden in Seren von Patienten mit klinischen Spätmanifestationen der Lyme-Borreliose festgestellt. Alle Patientenseren waren im FBA-, vor allem im spezifischen FBA-Abs-Test positiv. Die Titerdifferenz zwischen dem FBA- vor der Absorption und dem FBA-Abs-Test nach Absorption mit einem T. phagedenis-Ultrasonikat bewegte sich um eine Titerstufe.

Der fraktionierte IgM-FBA-Abs-Test fiel nur bei einem Patienten mit asymptomatischer Lyme-Borreliose negativ aus. Negative oder niedrige IgG-Antikörpertiter im Borrelia-IgG-ELISA wurden ausschließlich in den Seren von Patienten mit ECM festgestellt. Alle Patientenseren, die im Borrelia-IgG-ELISA negativ waren, zeigten eine Reaktivität im Borrelia-IgM-ELISA. Bei einem Patienten mit asymptomatischer Lyme-Borreliose fiel sowohl der fraktionierte IgM-FBA-Abs-Test als auch der Borrelia-IgM-ELISA negativ aus. Bei zwei Patienten mit klinischen Spätmanifestationen (LA, ACA) der Lyme-Borreliose war der Borrelia-IgM-ELISA trotz des positiven Ausfalls vom fraktionierten IgM-FBA-Abs-Test negativ (Tabelle 2).

In Tabelle 3 sind einige Beispiele von Antikörperverläufen in Seren von Patienten mit verschiedenen klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose nach antibiotischer Behandlung dargestellt. Beim Patienten mit Erythema chronicum migrans waren die spezifischen Borrelien-Tests bei der ersten Serumuntersuchung noch negativ. Erst bei der zweiten Untersuchung drei Wochen später wurden spezifische IgM-Antikörper nachgewiesen. Etwa acht Monate nach antibiotischer Behandlung mit Doxycyclin waren weder spezifische IgG- noch IgM-Antikörper nachweisbar. Beim Patienten mit Lyme-Carditis fielen hohe IgG- und IgM-Antikörper in den spezifischen Borrelien-Tests bereits bei der ersten Serumuntersuchung auf. Etwa zehn Monate nach antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon waren sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper nicht mehr nachweisbar. Bei den Patienten mit Lyme-Arthritis und Acrodermatitis chronica atrophicans wurden schon bei der jeweils ersten Serumuntersuchung sehr hohe spezifische IgG- und IgM-Antikörpertiter festgestellt. Etwa sieben bis zehn Monate nach antibiotischer Behandlung mit Ceftriaxon waren keine IgM-Antikörper mehr nachweisbar, während die Borrelien-spezifischen IgG-Antikörper weiter persistierten.

Durch Korrelation der Borrelien-spezifischen IgG-Antikörpertiter und der Gesamt-IgG-Konzentrationen in Serum/Liquor-Proben von Patienten mit

Tabelle 1. Mittlere reziproke Antikörpertiter der Kontrollgruppen in Borrelien-Tests und im TPHA

Gruppe	Zahl der Patienten	BO-HA ¹	FBA ²	FBA-Abs ³	Borrelia IgG-ELISA ⁴	Borrelia IgM-ELISA	TPHA ⁴
1	20	<20	<5	<5	<200	<40	<20
2	12	<20	160	<5	<200	<40	<20
3	5	<20	160	<5	<200	<40	160
4	5	<20	2 560	<5	800	<40	10 240

Gruppe 1: Gesunde Erwachsene. Gruppe 2: Patienten mit Hauteffluoreszenzen unklarer Genese zum Ausschluß einer Lyme-Borreliose. Gruppe 3: Primärsyphilis. Gruppe 4: Sekundärsyphilis.

¹ Borrelia-Hämagglutinationstest. ² Fluoreszenz-Borrelia-Antikörpertest. ³ Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptionstest. ⁴ Treponema-pallidum-Hämagglutinationstest.

Neuroborreliose war es möglich, eine intrathekale Synthese B. burgdorferi-spezifischer IgG-Antikörper zu bestimmen. Die Bestimmung des intrathekalen B. burgdorferi-Antikörper (IBBA)-Indexes erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{IgG-Antikörpertiter (Liquor)} \times \text{Gesamt-IgG (Serum)}}{\text{Gesamt-IgG (Liquor)} \times \text{IgG-Antikörpertiter (Serum)}}$$

Mit dieser Formel wurde beispielsweise bei zwei Patienten mit Neuroborreliose ein IBBA-Index von 7,9 und 7,7 festgestellt (Tabelle 4). Bei dem Patienten mit der Lyme-Borreliose-Erkrankung ohne klinische und proteinchemische Anzeichen für eine Beteiligung des Zentralnervensystems an der

Infektion lag der IBBA-Index mit 1,4 im Normbereich (0,5–2,0). Ein IBBA-Index von 7,9 bedeutete, daß der Anteil der B. burgdorferi-spezifischen IgG-Antikörper pro mg Gesamt-IgG im Liquor gegenüber dem Wert im Serum 7,9fach höher lag.

Diskussion

Der indirekte Immunfluoreszenztest, der als erster Test in die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose eingeführt wurde [1, 12], zeigte, daß nicht nur Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose, sondern auch

Tabelle 2. Reziproke B. burgdorferi-Antikörpertiter in Seren von Patienten mit verschiedenen klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose oder einer Zeckenstichanamnese

Patient	Klinische Diagnose	BO-HA ¹	FBA ²	FBA-Abs ³	Frakt. IgM-FBA-Abs	Borrelia IgG-ELISA	Borrelia IgM-ELISA
S. L.	ECM ⁴	<20	160	80	80	<200	320
C. W.	ECM	<20	160	80	80	<200	160
D. A.	ECM	<20	160	80	80	<200	320
P. K.	ECM	<20	160	80	80	800	640
G. H.	ECM	<20	640	320	80	12 800	320
M. J.	ECM	40	80	80	80	<200	640
G. R.	ECM	40	160	160	160	<200	5 120
G. B.	ECM	80	160	80	80	12 800	320
E. I.	ECM	40	160	80	80	800	320
S. M.	ECM	40	320	160	160	3 200	640
K. H.	LBC ⁵	1 280	320	160	80	12 800	320
B. W.	LBC	160	320	160	80	51 200	160
N. U.	LBC	2 560	640	320	640	12 800	2 560
P. E.	LC ⁶	640	320	160	80	12 800	160
J. A.	LC	1 280	160	80	160	12 800	320
H. P.	NB ⁷	320	160	80	80	12 800	320
R. P.	NB	160	160	80	80	51 200	160
S. I.	NB	160	160	80	80	12 800	320
Z. E.	NB	160	160	80	160	12 800	1 280
A. W.	NB	640	320	160	160	819 200	1 280
B. H.	NB	640	320	160	80	51 200	160
L. J.	NB	< 20	640	320	640	12 800	1 280
B. K.	LA ⁸	320	160	80	80	51 200	160
K. P.	LA	1 280	320	160	320	51 200	5 120
K. A.	LA	80	320	160	160	51 200	<40
G. W.	LA	10 240	640	320	160	204 800	640
S. E.	ACA ⁹	20 480	640	320	80	204 800	160
E. A.	ACA	2 560	640	320	80	204 800	<40
B. V.	ACA	5 120	320	160	160	204 800	1 280
S. W.	ACA	1 280	640	320	160	204 800	320
H. J.	ACA	640	320	160	80	204 800	160
N. U.	asympt. ¹⁰	2 560	2 560	1 280	80	819 200	320
M. H.	asympt.	5 120	1 280	640	160	819 200	320
B. G.	asympt.	640	1 280	640	80	819 200	640
C. L.	asympt.	2 560	1 280	640	<5	204 800	<40

¹ Borrelia-Hämagglutinationstest.

² Fluoreszenz-Borrelia-Antikörpertest.

³ Fluoreszenz-Borrelia-Antikörper-Absorptionstest.

⁴ Erythema chronicum migrans.

⁵ Lymphadenitis benigna cutis.

⁶ Lyme-Carditis.

⁷ Neuroborreliose.

⁸ Lyme-Arthritis.

⁹ Acrodermatitis chronica atrophicans.

¹⁰ Asymptotisch jedoch länger zurückliegende Zeckenstichanamnese.

Tabelle 3. Zeitverlauf reziproker *B. burgdorferi*-Antikörpertiter in Seren von Patienten mit verschiedenen klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose nach antibiotischer Behandlung

Klinische Diagnose	Datum der Serumgabe	BO-HA	FBA	FBA-Abs	Frakt. IgM-FBA-Abs	Borrelia IgG-ELISA	Borrelia IgM-ELISA
ECM	23. 10. 92	<20	<5	<5	<5	<200	<40
	14. 11. 92*	<20	160	80	80	<200	320
	14. 02. 93	<20	160	80	40	800	160
	15. 04. 93	<20	80	40	40	800	80
	23. 07. 93	<20	<5	<5	<5	<200	<40
LC	11. 09. 92**	640	640	320	80	12 800	320
	13. 11. 92	80	160	80	20	3 200	80
	30. 04. 93	<20	<5	<5	<5	<200	<40
LA	26. 10. 92**	2 560	640	320	160	204 800	640
	08. 02. 93	640	160	160	80	51 200	160
	12. 05. 93	320	80	40	20	12 800	80
	14. 08. 93	160	80	40	<5	3 200	<40
ACA	14. 08. 92**	20 480	2 560	1 280	160	204 800	1 280
	13. 10. 92	10 240	1 280	640	80	51 200	320
	14. 12. 92	2 560	320	320	40	12 800	80
	26. 03. 93	1 280	160	160	<5	12 800	<40
	04. 06. 93	1 280	160	80	<5	12 800	<40

ECM = Erythema chronicum migrans, LC = Lyme-Carditis, LA = Lyme-Arthritis, ACA = Acrodermatitis chronica atrophicans.

* Behandlung mit Doxycyclin 21 Tage, 2 × 0,1 g pro die.

** Behandlung mit Ceftriaxon i. v. 21 Tage, 1 × 2 g pro die.

Tabelle 4. Intrathekale Synthese *B. burgdorferi*-spezifischer IgG-Antikörper bei Patienten mit Neuroborreliose

Klinische Diagnose	Probe	Gesamt-IgG mg/l	Borrelia IgG-ELISA-Titer ¹	Serum/Liquor-Quotient für Gesamt-IgG	IgG-ELISA	IBBA ² -Index
LB ³	Serum Liquor	12 420 28	51 200 160	443	320	1,4
NB ⁴	Serum Liquor	11 230 142	12 800 1 280	79	10	7,9
NB ⁵	Serum Liquor	9 120 59	12 800 640	154	20	7,7

¹ Reziprok.² Intrathekaler *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-Index (Normal: 0,5–2,0).³ Lyme-Borreliose ohne Beteiligung des Zentralnervensystems an der Infektion.⁴ Neuroborreliose: Facialisparese, Polyradikulitis, 89 Zellen/μl Liquor.⁵ Neuroborreliose: Tetraspastik, Polyradikulitis, 43 Zellen/μl Liquor.

solche von Patienten mit Rückfallfieber-Borreliosen oder Syphilis hohe Antikörpertiter im FBA-Test aufwiesen [13–17]. Untersuchungen mit Kaninchenimmunseren gegen *Treponema pallidum*, *Treponema phagedenis*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrentis*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* ergaben, daß sie ebenfalls im FBA-Test mit unterschiedlich hohen Titern kreuzreagierten [18, 19]. Präabsorption der Seren mit ausreichenden Mengen von *T. phagedenis*-Ultrasonikat führte dazu, daß die kreuzreagierenden Antikörper mit Ausnahme solcher von *B. hermsii* und *B. recurrentis* erfolgreich entfernt werden konnten [13, 17, 18, 19].

Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Befunden überein. Alle Patientenserum der Kontrollgruppen war im FBA-Abs-Test negativ, obwohl der FBA-Test bei drei Kontrollgruppen mit unterschiedlich hohen Titern positiv ausfiel (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu waren alle Seren von Patienten mit klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose im FBA-Abs-Test positiv (Tabelle 2). Ein Mindesttiter von 1:64, der von verschiedenen Untersuchern bei der Einführung des FBA-Testes in die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose vorgeschlagen wurde [13, 20], ist für den spezifischen FBA-Abs-Test nicht mehr erforderlich. Einer-

seits könnten höhere Antikörpertiter im FBA-Test auftreten, ohne daß eine Lyme-Borreliose-Erkrankung vorliegt (Tabelle 1), andererseits sind niedrigere Titer im FBA-Abs-Test in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose als spezifisch anzusehen (Tabelle 2). Signifikante Titerunterschiede im FBA- und FBA-Abs-Test wurden bei fünf verschiedenen *B. burgdorferi*-Stämmen (B31, IRS, PKa, Fr, N34) mit teils unterschiedlichen Proteinmustern in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nicht festgestellt (Moskophidis, unpublizierte Daten).

Der BO-HA-Test, der aufgrund seiner Antigenzusammensetzung hauptsächlich Antikörper gegen die Oberflächen-Proteinantigene von *B. burgdorferi* erfaßt, zeichnete sich durch eine hohe Spezifität aus. Alle Seren der Kontrollgruppen einschließlich solcher von Patienten mit Syphilis fielen im BO-HA-Test negativ aus (Tabelle 1). Im Vergleich mit dem FBA-Abs-Test zeigte der BO-HA-Test eine gleich hohe Spezifität, die Sensitivität war jedoch insbesondere in den Seren von Patienten mit ECM niedriger (Tabelle 2). Hämagglutinierende Antikörper im BO-HA-Test sind wahrscheinlich unter anderen verantwortlich für die borreliazide Aktivität in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose [21]. Dafür sprechen auch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern, die gegen die Oberflächen-Proteinantigene von *B. burgdorferi* gerichtet waren und eine hämagglutinierende/agglutinierende und eine bakterizide Aktivität aufwiesen [22, 23, 24]. Die vorliegenden Untersuchungen lassen die Vermutung zu, daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von hämagglutinierenden Antikörpern und der Dauer der Infektion besteht (Tabelle 2).

Der FBA-Abs- und der BO-HA-Test erfassen sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper. Der Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern ist jedoch ein wichtiges Kriterium für die Persistenz des Erregers im Organismus und somit für die Behandlungsbedürftigkeit der Infektion. Mit Hilfe des fraktionierten IgM-FBA-Abs-Testes konnten signifikante spezifische IgM-Antikörpertiter in allen Seren von unbehandelten Patienten mit klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose nachgewiesen werden (Tabelle 2). Der negative Ausfall des fraktionierten FBA-Abs-Testes im Serum eines Patienten mit asymptomatischer Lyme-Borreliose ist entweder auf eine Spontanheilung oder auf eine in vivo-Blockierung der spezifischen IgM-Antikörpersynthese durch hohe IgG-Antikörpertiter gleicher Erreger-Spezifität zurückzuführen.

Die bisher beschriebenen ELISA's zum Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern in Seren von Patienten mit Lyme-Borreliose wiesen zwar eine relativ hohe Sensitivität auf, erreichten jedoch nicht die erforderliche Spezifität. Dies ist durch den Erreger bedingt, der, zur Gattung der Spirochäten gehörend,

eine Antigengemeinschaft mit anderen gramnegativen Bakterien aufweist [19]. Die meisten Autoren verwendeten als Antigen für den Borrelia-ELISA Ultrasonikate ganzer Bakterienzellen [20, 25, 26]. Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten über eine Verbesserung der Sensitivität und/oder der Spezifität des ELISA's bei Verwendung von Flagellen [27], einer angereicherten Flagellin-Präparation [28] oder einer Oberflächen-Proteinfraktion [29, 30] als Antigen. Eine wesentliche Verbesserung der Sensitivität und insbesondere der Spezifität des Borrelia-ELISA's ließ sich auch bei der Verwendung der Capture-Technik [31, 32] oder von rekombinanten Antigenen [33] nicht feststellen. Auffallend war, daß der ELISA bei allen Untersuchern ohne Präabsorption der Seren mit einem *T. phagedenis*-Ultrasonikat durchgeführt wurde.

Der Borrelia-ELISA, der in der vorliegenden Studie verwendet wurde, zeichnete sich durch eine hohe Sensitivität und eine gute Spezifität aus. In den Kontrollgruppen zeigte er eine nur geringe IgG-Kreuzreaktivität mit den hochtitrigen Seren von Patienten mit Sekundärsyphilis (Tabelle 1). Wahrscheinlich war die im Probenpuffer vorliegende *T. phagedenis*-Ultrasonikatkonzentration zu niedrig, um alle kreuzreagierenden IgG-Antikörper zu absorbieren. In allen 31 Seren von Patienten mit klinischen Manifestationen der Lyme-Borreliose wurden spezifische IgG- und/oder IgM-Antikörper im Borrelia-ELISA nachgewiesen (Tabelle 2). Ausschließlich IgM-Antikörper wurden nur in Seren von Patienten mit ECM gefunden. Grundsätzlich bestand eine Parallelität zwischen dem Borrelia-IgM-ELISA und dem fraktionierten IgM-FBA-Abs-Test. Der negative Ausfall des IgM-Borrelia-ELISA's bei zwei Seren von Patienten mit klinischen Spätmanifestationen läßt sich wahrscheinlich auf eine IgG-Kompetition zurückführen (Tabelle 2).

Der FBA-Abs-Test und der Borrelia-ELISA können trotz ihrer hohen Sensitivität im frühen Stadium der Infektion negativ ausfallen (Tabelle 3, ECM). Dies ist durch die Infektion begründet, denn bekanntlich entwickelt der Organismus nur langsam Antikörper gegen *B. burgdorferi* oder *T. pallidum*. Die klinische Symptomatik eines syphilitischen Primäraffektes (Ulcus durum) oder eines ECM steht also im Widerspruch zur negativen Antikörper-Serologie. Dieses Problem kann nicht durch eine einmalige Antikörper-Diagnostik, sondern einzig und allein durch Verlaufskontrollen im Abstand von 2–3 Wochen gelöst werden.

Literatur

1. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317-1319
2. Steere AC (1989) Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321, 586-596
3. Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Peter O, Aeschlimann A (1983) Isolation of a cultivable spirochete from Ixodes ricinus ticks of Switzerland. *Curr. Microbiol.* 8, 123-126
4. Callister SM, Case KL, Schell RF (1990) Diagnostic testing for Lyme disease. *Labmedica*, 2/3, 11-14
5. deKoning J, Bosma RB, Hoogkamp-Korstanje JAA (1987) Demonstration of spirochaetes in patients with Lyme disease with a modified silver stain. *J. Med. Microbiol.* 23, 261-267
6. Park HK, Jones BE, Barbour AG (1986) Erythema chronicum migrans: diagnosis by monoclonal antibodies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 15, 406-410
7. Debue M, Gautier P, Hackel C, van Elsen A, Herzog A, Bigaignon G, Bollen A (1991) Detection of *Borrelia burgdorferi* in biological samples using the polymerase chain reaction assay. *Res. Microbiol.* 142, 565-572
8. Goodman JL, Jurkovich P, Kramber JM, Johnson RC (1991) Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. *Infect. Immun.* 59, 269-278
9. Melchers W, Meis J, Rosa P, Claas E, Nohlmans L, Koopman R, Horrevorts A, Galama J (1991) Amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin biopsies from patients with Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2401-2406
10. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G, Pfister W, Einhäupl K (1984) Repeated isolation of spirochetes from cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3, 564-565
11. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G (1985) Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. *Lancet* I, 1099
12. Barbour AG, Burgdorfer W, Grunwaldt E, Steere AC (1983) Antibodies of patients with Lyme disease to components of the ixodes dammini spirochete. *J. Clin. Invest.* 72, 504-515
13. Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Einhäupl K (1984) Serological diagnosis of Erythema chronicum migrans and related disorders. *Infection*, 29, 331-337
14. Hunter EF, Russel H, Farshy CE, Sampson JS, Larsen SA (1986) Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody-adsorption test for syphilis. *Sex. Transm. Dis.* 13, 232-236
15. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC (1987) Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J. Infect. Dis.* 156, 183-188
16. Rath P-H, Rögler F, Schönberg A, Pohle HD, Fehrenbach F-J (1992) Relapsing fever and its serological discrimination from Lyme borreliosis. *Infection*, 20, 283-286
17. Alfen I, Wellensiek HJ (1994) Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und der Syphilis. *Lab. med.* 18, 12-18
18. Luther B, Moskopididis M (1990) Antigenic cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Treponema pallidum* and *Treponema phagedenis*. *Zbl. Bakt.* 274, 214-226
19. Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B (1992) Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 224-232
20. Russel H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 149, 465-470
21. Callister SM, Schell RF, Lovrich SD (1991) Lyme disease assay which detects killed *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1773-1776
22. Barbour AG, Tessier SL, Hayes SF (1984) Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 45, 94-100
23. Cevenini R, Sambri V, Massaria F, La Placa M, Brocchi E, de Simone F (1992) Complement-mediated in vitro bactericidal activity of monoclonal antibodies reactive with outer-surface-protein OspB of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 90, 147-152
24. Moskopididis M, Luther B (1993) Monoclonal antibodies with in vitro borreliacidal activities define the outer surface proteins A and B of *Borrelia burgdorferi*. *Zbl. Bakt.* 279, 201-213
25. Craft TE, Grodzicki RL, Steere AC (1984) Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J. Infect. Dis.* 149, 789-795
26. Magnarelli LA, Meegan JM, Anderson JF, Chapell WA (1984) Comparison of indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20, 181-184
27. Hansen K, Asbrink E (1989) Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* flagellum enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 27, 545-551
28. Coleman JL, Benach JL (1987) Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: their role in early diagnosis. *J. Infect. Dis.* 155, 756-765
29. Grodzicki RL, Steere AC (1988) Comparison of immunoblotting and indirect enzyme-linked immunosorbent assay using different antigen preparations for diagnosis early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 157, 790-797
30. Magnarelli LA, Anderson JF, Barbour AG (1989) Enzyme-linked immunosorbent assay for Lyme disease: reactivity of subunits of *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 159, 43-49
31. Berardi VP, Weeks KE, Steere AC (1988) Serodiagnosis of early Lyme disease: analysis of IgM and IgG antibody responses by using an antibody-capture enzyme immunoassay. *J. Infect. Dis.* 158, 754-760
32. Hansen K, Pii K, Lebech A-M (1991) Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a μ -capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella. *J. Clin. Microbiol.* 29, 166-173
33. Fikrig E, Huguene ED, Berland R, Rahn DW, Hardin JA, Flavell RA (1992) Serologic diagnosis of Lyme disease using recombinant outer surface proteins A and B and flagellin. *J. Infect. Dis.* 165, 1127-1132