

Diagnostische Wertigkeit serologischer Verfahren bei der Diagnostik einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*

Diagnostic Value of Serological Test-Systems Used in Diagnosis of Infection With *Borrelia burgdorferi*

Anita F. Pöpperl, F. Noll

Zusammenfassung: Der Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*-Antigene steht nach wie vor im Mittelpunkt der Laboratoriumsdiagnostik der Lyme-Borreliose. Hinsichtlich der Aussagefähigkeit von in der Routineanalytik verwendeten Testsystemen sind nicht nur die analytische Sensitivität und Spezifität der verwendeten Testsysteme entscheidend, sondern auch die diagnostische Wertigkeit der jeweiligen Testergebnisse.

Untersucht wurden neben einem klinisch definierten Serum-Panel von 194 Patienten insgesamt 220 weitere nicht-selektionierte Seren aus der Routineanalytik des Institutes für Medizinische Diagnostik in Berlin. Die Ergebnisse zeigen beim Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper sehr deutlich, dass bei der Verwendung nur eines Testsystems als Screening-Test ein hoher Prozentsatz bereits positiver Proben nicht detektiert werden kann. Nur die gleichzeitige Verwendung von verschiedenen Testsystemen (ELISA und Immunoblot), insbesondere in der Frühphase einer Borrelieninfektion, führt zu einer ausreichend hohen Nachweis-sensitivität.

Ziel der vorliegenden Studie war daher nicht der Nachweis von Sensitivität oder Spezifität einzelner Testverfahren, sondern vielmehr die Darstellung der Problematik bei der Anwendung serologischer Testverfahren im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Analytik zur Diagnostik der Lyme-Borreliose.

Schlüsselwörter: *Borrelia burgdorferi*; Lyme-Borreliose; Labordiagnostik; Serologie; ABICAP®-Verfahren; Immunoblot.

Summary: The serological detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi*-antigens is still a central part in the laboratory diagnosis of the Lyme disease. For the evidence of a test system used in routine analysis not only the sensitivity and specificity of the assays used but also the reliability of the results obtained is important.

We examined a clinically defined sera-panel of 194 patients and another 220 non-selected sera from the

routine analytical process in the Institut für Medizinische Diagnostik in Berlin.

The results clearly demonstrate that a high percentage of positive sera will not be detected using only one test system as screening assay. Only the combined use of different test systems (ELISA and immunoblot), especially in the early stages of infection with *Borrelia burgdorferi*, leads to a sufficient high sensitivity of detection.

The presented study was preferentially not intended to determine sensitivity oder specificity of single assays but was carried out to demonstrate the main problems using serologically based assays during daily routine analysis for diagnosis of Lyme disease.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*; Lyme borreliosis; laboratory diagnosis; serology; ABICAP® procedure; immunoblot.

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste vektorvermittelte Erkrankung des Menschen in Nordamerika und Europa. Der Erreger, *Borrelia burgdorferi*, wird durch Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* übertragen. Die klinische Diagnose der Lyme-Borreliose ist aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes [1], der häufig unspezifischen Symptomatik und der Vielzahl der möglichen klinischen Differentialdiagnosen oft schwierig.

Der direkte Nachweis von *Borrelia burgdorferi* durch die bakteriologische Kultur ist langwierig und schwierig. Die Erfolgsraten bei Kultivierung sind bei Hautbiopsien am höchsten (40 - 70%), verglichen mit nur <10% bei Liquorproben und <1% aus Blutproben [2]. Die Kultivierung von *Borrelia burgdorferi* ist daher als diagnostische Routinemethode schlecht geeignet, insbesondere da die Erregerdichte im Untersuchungsmaterial meist sehr niedrig ist.

Molekularbiologische Methoden zum direkten Erregernachweis erreichen eine diagnostische Sensitivität (in Abhängigkeit von der gewählten Methodik) von etwa 50 - 70% aus Hautbiopsien und von ca. 25% bis zu 90% aus dem Urin [3,4] bei manifestem Erythema migrans, aus dem Gelenkpunktat bei Lyme-Arthritiden werden ebenfalls Sensitivitäten von bis zu 90% angegeben [5, 6]. Nukleinsäureamplifikationstechniken

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Dr. Franz Noll; Institut für Medizinische Diagnostik, Nicolaistr. 22, D-12247 Berlin; Fax: 030-77001-332

Eingegangen: 17. September 1999/Angenommen: 16. Februar 2000

stellen derzeit eine mögliche Ergänzung jedoch keinen Ersatz der serologischen Routineverfahren dar [7].

Die Diagnose einer Lyme-Borreliose beruht daher im wesentlichen noch immer auf dem Nachweis Borrelien-spezifischer IgG- und/oder IgM-Antikörper im Serum bzw. Liquor cerebrospinalis oder im Gelenkpunktat. Bis auf extrem seltene, anhaltend seronegative Verläufe führt die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* in der Regel zu einer meßbaren humoralen Immunantwort [8]. Diagnostische Einschränkungen ergeben sich aufgrund

1. einer niedrigen diagnostischen Sensitivität während der Frühphase der Erkrankung durch eine sich nur langsam entwickelnden Immunantwort [9, 10, 11];
2. der fehlenden Unterscheidungsmöglichkeit zwischen akuter und zurückliegender Infektion [12] durch die häufige Antikörperpersistenz nach überstandener Erkrankung und
3. des Auftretens von unspezifischen IgM-Antikörpern z.B. bei EBV-Infektionen [8].

Zudem korreliert die Höhe der IgG-Immunantwort nur bedingt mit der klinischen Symptomatik [12] und das individuelle serologische Profil eines erkrankten Patienten ist in hohem Maße abhängig vom Stadium der Erkrankung, der Krankheitsdauer sowie einer Antibiotikatherapie und dem jeweiligen Erregertyp.

Serologische Nachweisverfahren zur Detektion Borrelien-spezifischer Antikörper wie Hämagglutinationsteste, Immunfluoreszenzteste, Enzymimmunoassays oder auch Immunoblotverfahren erreichen einzeln angewendet die von den entsprechenden Fachorganisationen z. B. der EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis) geforderten Spezifikitätskriterien von über 98% nicht [13].

Im Gegensatz zu den Verhältnissen in den USA gibt es in Europa derzeit keinerlei Standardisierung der verschiedenen Testmethoden oder der Ergebnisinterpretation. Eine befriedigende Qualitätskontrolle kommerzieller und nicht kommerzieller Tests findet derzeit ebenfalls nicht statt.

Verschiedene Fachgesellschaften (z.B. die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie – DGHM) haben sich daher den von den entsprechenden Kommissionen in den USA festgelegten diagnostischen Standards angeschlossen.

Die empfohlenen Richtlinien in den USA [14] sehen bei der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose ein sogenanntes Zwei-Stufen-Verfahren vor, in dem ein Screeningtest (ELISA oder IFT) bei fraglichem oder positivem Ergebnis von einem Western-Blot bestätigt werden soll. Diese Verfahrensweise ist für die USA möglich, da dort die Lyme-Borreliosen praktisch ausschließlich durch *Borrelia burgdorferi sensu strictu* verursacht werden. In Anbetracht der Borrelien-Diversität in Mitteleuropa hat sich z.B. das Land Brandenburg zu dazu abweichenden Empfehlungen entschlossen [15]. Die WHO empfiehlt eine minimale Spezifität der eingesetzten serologischen Tests von 98% [13]. Wenn diese Spezifität nicht von einem Test erreicht werden kann, sollten je nach regionaler Situation Test-

kombinationen verwendet werden. Mit dieser Formulierung wird dem Unterschied zwischen den USA und Europa/Asien Rechnung getragen.

Die Problematik der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose insbesondere in der laborärztlichen Routinediagnostik soll in dieser Arbeit anhand von ausgewählten als auch nicht ausgewählten Seren von Patienten dargestellt werden.

Eine Vorgehensweise in Form einer Stufendiagnostik wie es die amerikanischen Empfehlungen vorsehen, kann für den europäischen Raum aufgrund der Antigendiversität und insbesondere der fehlenden Standardisierung der Testsysteme [16] auch nach den in dieser Studie dargestellten Ergebnissen nicht generell empfohlen werden.

Material und Methoden

Untersuchte Seren

Die Daten wurden erhoben an 220 Seren aus der Routinediagnostik vom September 1998, Anforderung – Borrelien-Antikörper und an 194 ausgesuchten Fällen mit bekannter klinischer Symptomatik der Jahre 1997 und 1998.

Verwendete serologische Testsysteme

Zur Erstellung von vergleichbaren Daten für die vorliegende Studie wurden gezielt Testverfahren ausgewählt, die mit den gleichen Antigenen arbeiten, nämlich 1. ABICAP®-Test für *Borrelia* IgG und *Borrelia* IgM (Firma ABION GmbH, Jülich; Stammisolat: *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, ATCC-Nr: 35211) und 2. *Borrelia burgdorferi* IgG/IgM-Immunoblot der Firma Genzyme Virotech GmbH (Rüsselsheim; Stammisolat: *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, Stamm 2591). Im Gegensatz zu den herkömmlichen ELISA-Verfahren beruht das ABICAP®-Verfahren auf dem Prinzip der Mikroimmunaffinitätschromatographie mit nachfolgendem nicht-kompetitiven Sandwich-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von IgG- und IgM-Antikörpern. Die Testdurchführungen erfolgten jeweils nach den Angaben der Hersteller. Die Auswertung und Beurteilung der ABICAP®-Ergebnisse sowie die Interpretationskriterien für den IgG- und IgM-Immunoblot wurden ebenfalls nach Anbietervorschrift vorgenommen. Der Immunoblot wird „positiv“ bewertet, wenn mindestens zwei der hochspezifischen Banden (p83, p39, p34/OspB, p31/OspA, p25-22/OspC, p20 und p18) nachweisbar sind; „grenzwertig“ wurde der Immunoblot dann beurteilt, wenn nur eine hochspezifische Bande und/oder mehrere unspezifische Banden nachgewiesen wurden. „Negativ“ wurde der Immunoblot dann bewertet, wenn keine oder nur unspezifische Banden nachweisbar waren. Ein isoliertes Auftreten der p41-Bande führte zu einer Einstufung als „grenzwertig“. Die Auswertung des Bandenmusters bei den IgM-Immunoblots erfolgte nach denselben Kriterien wie bei den IgG-Immunoblots. Das Vorliegen von kreuzreaktiven Antikörpern gegen *Treponema pallidum* wurde

Tabelle 1 Bestimmung Borrelien-spezifischer IgG-Antikörper (n = 220).

positive Seren (n = 41)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	20	12	7	1
Grenzwertig	4	4	0	0
Negativ	17	17	0	0

grenzwertige Seren (n = 16)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	0	0	0	0
Grenzwertig	9	0	9	0
Negativ	7	0	7	0

negative Seren (n = 163)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	6	0	2	4
Grenzwertig	5	0	0	5
Negativ	152	0	47	105

mittels eines TPHA-Testes (Hersteller: Firma LD Labor Diagnostika GmbH, Heiden) bei allen untersuchten Seren ausgeschlossen.

Kriterien für die Gesamtbeurteilung der untersuchten Seren

Seren wurden dann als „**positiv**“ bewertet, wenn entweder

- das positive Ergebnis des ABICAP®-Testes durch den Immunoblot bestätigt wurde oder
- nur der Immunoblot allein ein (bei negativen oder grenzwertigen ELISA-Ergebnissen) positives Ergebnis lieferte oder
- aufgrund bekannter anamnestischer Daten und/oder vorliegender Vorbefunde des betreffenden Patienten ein alleinig positives Ergebnis des ABICAP®-Testes (auch bei Vorliegen eines negativen oder nur grenzwertigen Blotergebnisses) verifiziert werden konnte.

Seren wurden dann als „**grenzwertig**“ bewertet, wenn entweder

- das grenzwertige Ergebnis des ABICAP®-Testes durch den Immunoblot ebenfalls grenzwertig bestätigt wurde oder
- nur der Immunoblot allein ein grenzwertiges Ergebnis lieferte

Seren wurden dann als „**negativ**“ bewertet, wenn entweder

- das negative Ergebnis des ABICAP®-Testes durch den Immunoblot ebenfalls negativ bestätigt wurde oder
- nur der Immunoblot allein (auch bei positiven oder grenzwertigen ELISA-Ergebnissen) ein negatives Ergebnis lieferte oder

- aufgrund bekannter klinisch-anamnestischer Daten und weiterer vorliegender Befunde auch bei einem grenzwertigen Immunoblot-Ergebnis eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* unwahrscheinlich war. Diese Bewertungskriterien wurden sowohl für die Bestimmung der IgG-Antikörper als auch für die Bestimmung der IgM-Antikörper zugrunde gelegt.

Ergebnisse

1. Seren aus der Routinediagnostik (n = 220) vom September 1998

IgG-Bestimmung

Von insgesamt 220 untersuchten Seren wurden 41 Seren mit der Gesamtbewertung „positiv“ klassifiziert, 16 Seren wurden als „grenzwertig“ eingestuft und 163 Seren wurden mit „negativ“ bewertet (s. Tabelle 1). Der Anteil der positiven Seren nach der Gesamtbeurteilung beträgt damit insgesamt 18,6% und liegt deutlich über dem geschätzten Durchseuchungsgrad der Berliner Bevölkerung. Die Indikationen zur Bestimmung der Borrelien-spezifischen Antikörper zeigen nahezu das gesamte Spektrum der durch *Borrelia burgdorferi*-Infektionen hervorgerufenen klinischen Bilder, am häufigsten sind jedoch Anforderung ohne nähere klinische Angaben bzw. mit der alleinigen Angabe „Zeckenstich“. Die Beurteilung der positiven bzw. grenzwertigen serologischen Befunde ist daher nur in wenigen Ausnahmefällen direkt unter Bezugnahme auf die entsprechenden klinischen Angaben möglich. In den meisten Fällen erfolgte daher die Endbeurteilung des serologischen Befundes erst nach telefonischer

Tabelle 2 Bestimmung Borrelien-spezifischer IgM-Antikörper (n = 220).

positive Seren (n = 48)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	28	7	16	5
Grenzwertig	6	6	0	0
Negativ	14	14	0	0
grenzwertige Seren (n = 19)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	28	7	16	5
Grenzwertig	6	6	0	0
Negativ	14	14	0	0
negative Seren (n = 153)		Immunoblot		
ABICAP®-Verfahren		Positiv	Grenzwertig	Negativ
Positiv	14	0	0	14
Grenzwertig	19	0	1	18
Negativ	120	0	29	91

Rücksprache mit dem behandelnden Arzt, so dass alle serologisch als „positiv“ bewerteten Seren entsprechend verifiziert werden konnten.

Bei alleiniger Anwendung des ABICAP®-Verfahrens zum Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper der IgG-Klasse konnten von 41 nur 20 = 49% der Seren eindeutig positiv detektiert werden; 4 Seren = 9,7% wurden vom Testverfahren noch grenzwertig beurteilt. In 17 Fällen = 41% konnten Borrelien-spezifische IgG-Antikörper mittels ABICAP®-Verfahren nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu ELISA-Testen anderer Hersteller (und Verwendung anderer Antigene) ergaben sich keine wesentlichen qualitativen Unterschiede beim Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper (Daten hier nicht gezeigt). Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Fälle (n=220) entspricht dies bei ausschließlicher Verwendung eines sogenannten Screening-Testes einer Rate von insgesamt 7,7% falsch negativer Befunde. In allen Fällen lieferte nur die gleichzeitige Durchführung auch eines Immunoblots hier den serologischen Hinweis auf das Vorliegen einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Bei Verwendung des Immunoblots als Screeningverfahren wäre nur ein Serum falsch negativ detektiert worden; allerdings erhalten wir eine sehr hohe Rate von ca. 33% an fraglichen („grenzwertigen“) Befunden (n=72); im ABICAP®-Verfahren werden insgesamt nur 18 Seren (= 8,2%) nicht eindeutig positiv oder negativ gefunden. Dies bedeutet, dass in etwa einem Drittel der Fälle eine Zweituntersuchung notwendig wird.

IgM-Bestimmung

Von insgesamt 220 untersuchten Seren wurden 48 Seren mit der Gesamtbewertung „positiv“ klassifiziert,

19 Seren wurden als „grenzwertig“ eingestuft und 153 Seren wurden mit „negativ“ bewertet (s. Tabelle 2). Der Anteil der positiven Seren beträgt damit insgesamt 21,8% und liegt, wie erwartet, etwas über dem Anteil der IgG-positiven Seren. Die Gesamtbeurteilung erfolgte entsprechend wie bei der Klassifizierung der IgG-Bestimmung. Von insgesamt 48 positiven Seren werden 28 = 58,3% vom ABICAP®-Verfahren eindeutig detektiert, 6 Seren = 12,5% werden noch grenzwertig gefunden, bei der Untersuchung von 14 Seren = 29,1% können keine Borrelien-spezifischen IgM-Antikörper nachgewiesen werden. Auf die Gesamtzahl der untersuchten Seren bezogen, entspricht dies einem Gesamtanteil von 6,3% falsch negativen Ergebnissen. Bei alternativer Anwendung des Immunoblots als alleinigem Untersuchungsverfahren wären = 2,3% von 220 untersuchten Seren nicht als positiv erkannt, 16 Seren = 7,3% nur als grenzwertig detektiert worden.

2. Analyse selektionierter Seren aus der Routinediagnostik (n = 194) von Patienten mit bekannter klinischer Symptomatik

Für alle hier untersuchten Seren waren die klinischen Daten der Patienten bekannt. Das Indikationsspektrum zur Bestimmung Borrelien-spezifischer Antikörper reichte dabei von Kontrolluntersuchungen nach Zeckenstich über entsprechende Titerbestimmungen bei definierter klinischer Symptomatik (Erythema migrans, Neuroborreliose, Lyme-Arthritis, Acrodermatitis chronica atrophicans und verschiedene andere mit Borrelien-Infektionen assoziierte Krankheitsbilder) bis zu Titerverlaufskontrollen nach Therapie oder Verdacht auf Reinfektionen bzw. Reaktivierungen (s. Tabelle 4).

Tabelle 3 Bestimmung Borrelien-spezifischer Antikörper in vorselektionierten Seren (n = 194).

IgG-Bestimmung	Immunoblot positiv	Immunoblot grenzwertig	Immunoblot negativ	Gesamtanzahl
ABICAP®-System				
positiv	39	19	13 (= 6,7%)	71
grenzwertig	12	13	12	37
negativ	18 (= 9,3%)	37	31	86
Gesamtzahl	69	69	56	194
IgM-Bestimmung				
ABICAP®-System				
positiv	56	9	45 (=23,2%)	110
grenzwertig	16	4	15	35
negativ	21 (= 10,8%)	8	20	49
Gesamtzahl	93	21	70	194

Tabelle 4 IgG-Antikörper-Nachweis - Einzelfallanalyse.

Klinische Symptomatik	Fallzahlen – gesamt		Elisa – negativ Blot – positiv	Fehldiagnosen
Zeckenstich	29	15 %	0	0 %
Erythema migrans	81	41,7%	9	11,1%
Neuroborreliose	27	14 %	3	11,1%
Lyme-Arthritis	29	15 %	2	6,9%
Acrodermatitis chronica atrophicans	3	1,5%	1	33,3%
Lymphadenitis cutis benigna	2	1,0%	0	0 %
sonstige	23	11,8%	3	13,0%
Gesamt	194	100 %	18	9,3%

In 29 (= 15%) Fällen wurde als Untersuchungsindikation „Zeckenstich“ angegeben, 81 (= 41,7%) der Patienten wiesen zum Untersuchungszeitpunkt ein Erythema migrans auf, 27 (= 14%) zeigten das klinische Bild einer Neuroborreliose (Diagnosestellung erfolgte nach klinischen Kriterien [z.B. Vorliegen eines Bannwarth-Syndroms] und/oder positiven pathophysiologischen Liquorparametern [Pleiozytose, Proteinerhöhung bzw. Nachweis der autochtonen intrathekalen Antikörper-Synthese]), 29 (= 15%) Patienten litten unter einer Lyme-Arthritis, in 3 Fällen (=1,5%) wurde die Bestimmung der Borrelien-Antikörper bei Vorliegen einer Acrodermatitis chronica atrophicans durchgeführt und in zwei Fällen (= 1%) lautete die klinische Diagnose Lymphadenitis cutis benigna. Unter 23 sonstige Indikationen fallen Kardiomyopathien, Pericarditiden, Titerkontrollen nach Therapie, Verdacht auf Reaktivierung oder Reinfektion, sowie Krankheitsbilder, für die eine Assoziation mit Borrelien-Infektionen vermutet wird z.B. das Erythema annulare [17] oder bei Patienten mit Hörsturz [18].

Im Rahmen der IgG-Bestimmung (s. Tabelle 3, oben) kommt es bei diesen Patienten mit klar definierten klinischen Krankheitsbildern bei der alleinigen Anwendung nur eines Testverfahrens zu einem Anteil von

9,3% (ABICAP®-Verfahren) bzw. 6,7% (Immunoblot) falsch negativen serologischen Ergebnissen. Bezogen auf die Gesamtfallzahl von n = 194 entspricht dies einem Anteil von insgesamt 16% falsch negativen Ergebnissen bei Anwendung nur eines Testverfahrens.

Bei der Bestimmung der IgM-Antikörper (s. Tabelle 3, unten) kommt es bei Anwendung des ABICAP®-Verfahrens in insgesamt 21 Fällen (= 10,8%) zu einer falsch negativen Bestimmung, bei alleiniger Anwendung des Blotverfahrens wird in 45 Fällen (= 23,2%) ein falsch negativer Befund erstellt. Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Seren wird in 66 Fällen (= 34%) ein falsch negatives Ergebnis erhalten.

Bei der Einzelfallanalyse (s. Tabelle 4) wurden insbesondere diejenigen Fälle betrachtet, in denen es zu diskrepanten Ergebnissen bei der Antikörper-Bestimmung mittels des ABICAP®-Verfahrens (negativ) und der Blottechnik (positiv) kam. Diese Patienten wären bei der Anwendung eines Screening-Verfahrens falsch negativ beurteilt worden.

Eine solche serologische Konstellation ist unter der Anamnese „Zeckenstich“ in keinem Fall beobachtet worden. Bei Vorliegen des klinischen Bildes eines Erythema migrans können mittels ABICAP®-Verfahren bei der Bestimmung der IgG-Antikörper in 9 Fäl-

Tabelle 5 IgM-Antikörper-Nachweis - Einzelfallanalyse.

Klinische Symptomatik	Fallzahlen – gesamt		Elisa – negativ Blot – positiv	Fehldiagnosen
Zeckenstich	29	15 %	0	0 %
Erythema migrans	81	41,7%	11	13,6%
Neuroborreliose	27	14 %	7	25,9%
Lyme-Arthritis	29	15 %	2	6,9%
Acrodermatitis chronica atrophicans	3	1,5%	0	0 %
Lymphadenitis cutis benigna	2	1,0%	0	0 %
sonstige	23	11,8%	1	4,3%
Gesamt	194	100 %	21	10,8%

len (= 11,1%) und bei der Bestimmung der IgM-Antikörper in 11 Fällen (= 13,6%) keine Antikörper nachgewiesen werden, der Blot hingegen zeigt hier bereits das Vorliegen Borrelien-spezifischer Antikörper an. Bei Vorliegen einer Neuroborreliose kommt es bei der Bestimmung der IgG-Antikörper ebenfalls zu 11,1% falsch negativen Ergebnissen, bei der IgM-Antikörperbestimmung liegt die Rate bei 25,9% (7 von 27 untersuchten Patienten). Am geringsten mit jeweils 6,9% ist die Rate der falsch negativen Ergebnisse bei Vorliegen einer Lyme-Arthritis. Die prozentualen Angaben bei Vorliegen einer ACA sind aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht aussagekräftig.

Bei der Bestimmung der IgM-Antikörper kommt es vergleichbar zu den Ergebnissen bei der Bestimmung der IgG-Antikörper zu einem Anteil von 10,8% (ABICAP®-Verfahren) bzw. 23,2% (Immunoblot) falsch negativen Ergebnissen und damit zu einem ebenfalls auf die Gesamtzahl bezogenen Wert von 10,8% falsch negativen Ergebnissen bei Anwendung des ABICAP®-Verfahrens als Screening-Test ohne gleichzeitige Verwendung eines zweiten Testverfahrens wie z.B. dem Immunoblot.

Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war nicht der Nachweis von Sensitivität oder Spezifität einzelner Testverfahren, sondern die Darstellung der Problematik bei der Anwendung serologischer Testverfahren im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Analytik. Besonders im ambulanten Bereich kommt es im wesentlichen darauf an, mit einem möglichst hohen Grad an diagnostischer Sicherheit positive von negativen serologischen Befunden zu unterscheiden, da die klinischen Angaben zum Patienten meist fehlen. Hierin liegt auch der wesentliche Unterschied zur Diagnostik im Rahmen eines stationären Aufenthaltes, wo eine direkte Zusammenarbeit zwischen Labormediziner und behandelndem Arzt vor Ort möglich ist. Im Rahmen der Borreliendiagnostik ist insbesondere die „falsch negative“ Beurteilung eines Serums entscheidend, da be-

troffene Patienten aufgrund eines falsch negativen Befundes u.U. nicht therapiert werden und somit die Gefahr einer Chronifizierung der Infektion in nicht unerheblichem Maße gegeben sein kann.

Bestimmung von Borrelien-spezifischen Antikörpern

Bei der Bestimmung der IgG-Antikörper (Tabelle 1) wurden von 163 negativen Seren der Routinediagnostik 3,7% vom ABICAP®-Test „falsch positiv“ und 3,0% grenzwertig ermittelt (negativer Immunoblot). Die Rate der „falsch negativen“ Befunde lag bei dieser Gruppe bei 7,7% (17 von 220 Fällen, s. Tabelle 1). Bei den vorselektionierten Seren betrug der Anteil „falsch positiver“ Ergebnisse 6,7%, der Anteil an grenzwertigen Ergebnissen 6,2% und die Rate an „falsch negativen Ergebnissen“ 9,3% (s. Tabelle 3 und 4).

Bei der Bestimmung der IgM-Antikörper (Tabelle 2) wurden von 153 negativen Seren aus der Routinediagnostik insgesamt 14 Seren (= 9,2%) „falsch positiv“ und 19 Seren (= 12,4%) grenzwertig ermittelt. „Falsch negative“ Befunde wurden in 14 von 220 Fällen (= 6,4%) erhalten. Bei den vorselektionierten Seren betrug der Anteil an „falsch positiven“ Seren insgesamt 23,2%, grenzwertige Ergebnisse wurden in 7,7% der Fälle ermittelt. Die Rate an „falsch negativen“ Befunden betrug insgesamt 10,8% (s. Tabelle 3 und 5).

Nur durch die gleichzeitige Untersuchung der Patienten mit einem Immunoblot konnten in den vorliegenden Fällen „falsch negative“ Befunde vermieden werden. Die Rate an „falsch negativen“ Befunden in dieser Untersuchungsreihe liegt damit etwas niedriger bzw. an der unteren Grenze des auch in der Literatur [19, 20] angegebenen Bereiches von ca. 10 - 15%.

Auswertekriterien für den Immunoblot

Bei der IgG-Bestimmung wurden vom Immunoblot von den 152 negativen Seren der Routinediagnostik nur 105 eindeutig negativ bestätigt. In 47 Fällen war der Immunoblot grenzwertig, wobei in den meisten lediglich die Flagellin-p41 Bande nachgewiesen werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Bewertungskriterien des Herstellers für den Immunoblot

für die Routineanalytik dahingehend modifiziert, dass ein isoliertes Auftreten der Bande p41 (auch in Kombination mit weiteren unspezifischen Banden) im Immunoblot beim Nachweis von IgG-Antikörpern als negatives Ergebnis zu betrachten ist.

Bei der Bestimmung der IgM-Antikörper detektiert der Immunoblot 16 Seren „grenzwertig“. Bei diesen Seren waren jedoch zumeist deutliche Markierungen der p41-Bande und/oder einer der hochspezifischen Proteine (p20; p22-p25; p31) festzustellen. Der Hersteller hat keine unterschiedlichen Beurteilungskriterien für IgG- und IgM-Antikörper angegeben. Die Intensität und Breite der Bandenmuster im IgM ist aufgrund der Konzentrationsunterschiede und der niedrigeren Affinität von IgM-Antikörpern der wesentlich geringer als in der vergleichbaren IgG-Antwort. Nach Untersuchungen von Dias et al. [21] erscheinen aber gerade in der Frühphase häufig nur IgM-Antikörper gegen p41 und OspC (p22-25) oder auch nur gegen OspC. Die Sensitivität des Immunoblots bezüglich des Nachweises von IgM-Antikörpern könnte also durch eine Veränderung der Beurteilungskriterien deutlich gesteigert werden; 89,6% der Seren könnten dann als „positiv“ beurteilt werden.

Der scheinbare Mangel an Sensitivität des Immunoblot gegenüber dem ABICAP®-System ist hauptsächlich bedingt durch die Auswertekriterien des Herstellers. Auch hier ist an eine entsprechende Modifizierung etwa in der von Wilske et al. [22] vorgeschlagenen Form (Nachweis von OspC gilt als „positiv“ bei der Bestimmung der IgM-Antikörper) zu denken. In vielen Fällen konnten Befundkonstellationen mit einem positiven Ergebnis im ABICAP®-System bei gleichzeitigem Nachweis einer OspC-Bande als Erythema migrans nach Zeckenstich verifiziert werden.

Trotz der deutlich niedrigeren Sensitivität des Immunoblots im Vergleich zum ABICAP®-System beim Nachweis von Antikörpern der IgM-Klasse zeigt sich bei der Einzelfallanalyse, dass insbesondere in den Frühstadien der Infektion (EM oder Neuroborreliose) der Immunoblot in vielen Fällen bereits vor dem ELISA ein positives Ergebnis anzeigt; diese hier gefundene deutlich höhere Sensitivität des Immunoblots gegenüber ELISA-Verfahren wird auch in anderen Studien beschrieben [23].

Fazit

Im Rahmen dieser Studie konnte deutlich gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Analyse der Antikörper mittels ABICAP®-Test und Immunoblot selbst bei Verwendung des gleichen Antigens im Testverfahren die Rate an „falsch negativen“ sowie auch an „falsch positiven“ Ergebnissen entscheidend zu reduzieren ist. Bei gleichzeitiger Anwendung zweier Testverfahren konnten „falsch negative“ Befunde mit hoher Sicherheit vermieden werden; unter Berücksichtigung der Sensitivität und Spezifität der jeweils verwendeten

Testverfahren ergibt sich eine diagnostische Sicherheit von fast 100%. Dieser Auffassung hat sich im April 1998 auch das Land Brandenburg im Rahmen einer Tagung des Berufsverbandes Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V. in einem Konsensus-Papier angeschlossen [15]. Danach sollte sich die serologische Diagnostik der Lyme-Borreliose in Mitteleuropa zur Zeit primär auf eine Kombination von IgG- und IgM-Enzymimmunoassays (oder vergleichbarer Verfahren) mit dem IgG- und IgM-Immunoblot stützen.

Unter Berücksichtigung der Forderungen nach Kostendämpfung im Gesundheitswesen führt die gleichzeitige Bestimmung Borrelien-spezifischer Antikörper mittels ELISA und Immunoblot unserer Meinung nach im Gegensatz zur Stufendiagnostik zu einer Kostensenkung, da Zweituntersuchungen, erneute Arztbesuche und prolongierte Behandlungen aufgrund von Therapieverzögerungen vermieden werden könnten, da ein Großteil der routinemäßig durchgeführten Untersuchungen gerade in der Frühphase einer Infektion und/oder bei unklarer klinischer Symptomatik erfolgt. Eine Stufendiagnostik ist in diesen Fällen nur dann sinnvoll, praktikabel und letztendlich auch kostensparend, wenn in Kenntnis und unter Einhaltung der derzeitigen Therapieempfehlungen (z.B. keine Behandlung bei negativen oder grenzwertigen Ergebnissen bei fehlender Klinik, keine Behandlung bei fehlender Klinik nach Zeckenstich, Zweituntersuchung bei unklaren serologischen und/oder klinischen Verhältnissen im Abstand von wenigen Wochen) und entsprechend enger Indikationsstellung verfahren würde. Dies ist derzeit jedoch - und dies zeigt die tägliche Praxis sehr deutlich - leider nicht der Fall.

Literatur

1. Wilske B, Pfister HW. Lyme borreliosis research. *Curr Opin Infect Dis* 1995;8:137-144.
2. Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:1076-1079.
3. Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hoffmann H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2658-65.
4. Schmidt B, Muellegger RR, Stockenhuber C, Soyer HP, Hoedl S, Luger A, Kerl H. Detection of *Borrelia burgdorferi* specific DNA in urine specimens from patients with erythema migrans before and after antibiotic therapy. *J Clin Microbiol* 1996;34:1359-63.
5. Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:685-690.
6. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *New Engl J Med* 1994; 330:229-234.
7. Goodman J. Polymerase chain reaction for tick-borne diseases: past, present and future. In: Gubler, DJ, Lane RS: eds. VII International Congress on Lyme Borreliosis, June 16-21, San Francisco, California. 1996; 52.
8. Wilske B. Diagnostik der *Borrelia burgdorferi*-Infektion. *Internist* 1995;8:137-144.
9. Ackermann R. Erythema chronicum migrans und durch Zecken übertragene Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth): Borrelien-Infektion? *Dtsch Med Wochenschr* 1983;108:577-580.

10. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease: *N Engl J Med* 1983; 308:733-40.
11. Horowitz HW, Pavia CS, Bittker S, Forseter G, Cooper D, Nadelman RB, Byrne D, Johnson RC, Wormser: Sustained cellular immune response to *borrelia burgdorferi*: lack of correlation with clinical presentation and serology. *Clin Diagn Lab Immun* 1994; 1:373-378.
12. Böhmer R, Tiller FW. Lyme-Borreliose 1996: Aktueller Wissenstand. *Clin Lab* 1996; 42: 835-841.
13. WHO Workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance, Warsaw, Poland 1995; WHO/CDS/VP/95.141.
14. Recommendations for test performance and Interpretation from the Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme disease. 1995: *MMWR*; 44: 590
15. Lyme-Borreliose – Empfehlungen für Brandenburg. Brandenburgisches Ärzteblatt, 1997; 7:304.
16. Dressler F. Probleme der Standardisierung in der Diagnostik der Lyme Borreliose. In: Talaska T, editor. Für die Praxis: Lyme-Borreliose, 1998; 68-69.
17. Aberer E, Kersten A, Klade H, Poitschek C, Jurecka W. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. *Am J Dermatopathol* 1996; 18:571-9.
18. Goldfarb D, Sataloff RT. Lyme disease: a review for the otolaryngologist. *Ear Nose Throat J.* 1994; 73:824-9.
19. Hamann-Brand A, Breitner S, Schulze J, Brade V. Laboratory diagnosis of Lyme disease. *Biotest Bulletin* 1995; 5: 127-142.
20. Krause A. 1998; pers. Mitteilung
21. Dias F. Interpretation of IgM Western Immunoblot banding pattern in patients suspected of having early Lyme disease. Abstr. V. International Conf. Lyme Borreliosis 1992; A100:10.
22. Wilske B, Fingerle V, Preac-Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofmann A, Loy H, Pfister HW, Rossler D, Soutschek E. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 1994; 182: 255-270.
23. Oschmann P, Schäfer C, Wellensiek HJ, Zebandt S, Dorndorf W. Intrathekale Synthese spezifischer Antikörper bei Neuroborreliose: Vergleich von Immunoblot, indirektem Immunfluoreszenztest und ELISA; 2. Frankfurt-Gießener Borrelien-Workshop 1997.



**Barbara J. Bain
David M. Clark
Irvin A. Lampert
Stefan Koch**

Knochenmark- pathologie Atlas und Lehrbuch

2000, 316 Seiten mit 389 Abbildungen und 17 Tabellen.
21 x 28 cm, Gebunden.

DM 248,- / GS 1610,- / SF 228,50

Vorbestellpreis: DM 198,- / GS 1445,- / SF 162,50

(gültig bis 31. Mai 2000)

ISBN 3-89412-361-3

JETZT ZUM GÜNSTIGEN VORBESTELLPREIS

Die Erforschung hämatologischer Erkrankungen hat in den letzten Jahren insbesondere unter Anwendung molekularbiologischer Methoden wesentliche Erkenntnisse und Fortschritte für die Diagnostik und Therapie erbracht. Aber auch nichthämatologische Erkrankungen erfordern zunehmend eine subtile prä- und posttherapeutische Beurteilung der Hämatopoese-Situation.

Mit der Knochenmarkpathologie steht das bereits aus zwei englischen Auflagen bekannte Grundlagenwerk nun erstmals als deutsche Ausgabe zur Verfügung. Die Usancen im deutschsprachigen Raum fanden Berücksichtigung.

In zehn Kapiteln werden alle wesentlichen Erkrankungen des Knochenmarks bzw. Erkrankungen, die sich unter Einbeziehung des Knochenmarks manifestieren können, erörtert – Infektionen und reaktive Veränderungen, myelo- und lymphoproliferative Erkrankungen sowie Tumoren, um nur einige zu nennen. Berücksichtigt werden dabei:

- routinemäßig gefärbte Knochenmarkspirate,
- Schnittpräparate paraffin- und kunststoffeingebetteter Knochenmarkbiopsien,
- der Stellenwert einzelner diagnostischer Verfahren, einschließlich der Immunzytochemie und Immunhistochemie.

Besonderer Wert wurde auf eine klare Gliederung, aussagekräftige Texte und eine reiche Bebilderung gelegt. In allen Abschnitten werden jeweils die Befunde des peripheren Blutes, des Knochenmarkaspirates und des Knochenmarkbiopsates in Synopsis abgehandelt.

Das Buch – Leitfaden und Nachschlagewerk zugleich – wurde gemeinschaftlich von Histopathologen und internistischen Hämatologen verfaßt und wendet sich an auszubildende und praktizierende Internisten und Pathologen, die sich mit der Diagnostik des Knochenmarks befassen.

Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin · Wien

Kurfürstendamm 57 · D-10707 Berlin · Infoline 030-32 79 06-27/28 · Fax 030-32 79 06-44 · e-mail: vertrieb@blackwis.de
Internet: <http://www.blackwell.de> · Preisstand: 15. April 2000 · Zu beziehen über den Buch- und Fachhandel