



Informationen zum serologischen Nachweis einer Borrelien-Infektion im DCL

Autor: Dr. Gerhard Czech-Schmidt

Der eindeutige Nachweis einer Infektion kann nur durch den direkten Erregernachweis (z.B. PCR, Mikroskopie oder Kultur) erbracht werden. Diese Methoden sind jedoch aufgrund der geringen Sensitivität für die Routinediagnostik von Borrelien-Infektionen nicht geeignet. Hier kommt dem indirekten Nachweis einer Infektion durch den serologischen Nachweis von Antikörpern mittels eines ELISAs, IFTs und IBs oder WBs eine besondere Bedeutung zu.

Eine Lyme-Borreliose kann durch unterschiedliche Borrelien-Genospezies ausgelöst werden. Dabei unterliegen die von den Borrelien präsentierten Antigene, gegen die Antikörper gebildet werden, einer starken Variabilität. Erfolgt der serologische Routinenachweis mit Testsystemen, die nur eine Auswahl an spezifischen Antigenen führen, und aufgrund der Annahme, dass die gegen Borrelien gebildeten Antikörper zwischen den unterschiedlichen Borrelien kreuzreagieren, sind falsch negative Ergebnisse zu erwarten. Ein falsch negativer Laborbefund kann dazu führen, dass ein begründeter klinischer Verdacht verworfen wird und die tatsächliche Ursache der klinischen Symptome nicht behandelt wird.

Ein positiver serologischer Laborwert deutet auf eine stattgefundene Infektion hin. Diese Infektion kann jedoch asymptomatisch verlaufen, so dass in solchen Fällen ein Krankheitsbild nicht vorliegt und dementsprechend eine Behandlungsbedürftigkeit nicht besteht. Somit sollte eine serologische Untersuchung nur anhand des klinischen Verdachts vom behandelnden Arzt empfohlen werden.



Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| Ak | Antikörper |
| B.a. | Borrelia afzelii |
| B.b. | Borrelia burgdorferi |
| B.g. | Borrelia garinii |
| DCL | Deutsches Chroniker Labor |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| IB | Immunoblot |
| IFT | Immunfluoreszenztest |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| NRZ | Nationales Referenzzentrum für Borrelien |
| OspC | outer surface protein C |
| RKI | Robert Koch-Institut |
| VlsE | Variable major protein like sequence Expressed |
| WB | Westernblot |



Wahl der Testsysteme

Die Wahl der Testsysteme im DCL (Volllysat WBs und IFTs) und der Umfang der serologischen Untersuchungen gehen auf eine Kooperation mit einer Hannoverschen Klinik zurück.

In enger Zusammenarbeit mit den behandelnden Ärzten der Klinik wurden aus der Vielzahl der auf dem Markt vorhandenen Testsysteme die Tests gewählt, die mit dem klinischen Bild einer Borreliose vereinbar waren.

In einer zweiten Phase wurden unsere positiven Proben an mehrere Laboratorien zur Untersuchung verschickt, so dass unsere positiven Ergebnisse zumindest in einem weiteren Laboratorium bestätigt werden konnten (nähere Informationen zu unserem Testpendel im Anhang).

1. IFT (ImmunFluoreszenzTest)

Als Suchtests werden ein ELISA oder ein IFT empfohlen.¹

Der IFT ist bei Verdacht auf eine Borrelien-Infektion zur Bestimmung des Antikörpertiters am besten geeignet. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch Flagellin, das auch bei vielen anderen Bakterien vorkommt, ist aufgrund des internen Flagellins der Borrelien ausgeschlossen (die wenigen an der Oberfläche vorhandenen 41 kDa Antigene sind bei der Auswertung unter dem Mikroskop nicht sichtbar). Kreuzreaktionen mit z.B. *Treponema pallidum* sind unwahrscheinlich und können in weiteren Tests gänzlich ausgeschlossen werden.

- **Besonderheiten des IFTs**

Bei der Testdurchführung muss beachtet werden, dass hohe IgM-Antikörperkonzentrationen einer Probe zu falsch negativen Ergebnissen führen können!

2. Immunoblot (IB)

Für den Nachweis einer Borrelien-Infektion steht eine Vielzahl von unterschiedlichen IBs zur Verfügung. Dabei sind die preislichen und qualitativen Unterschiede enorm. Bei den von uns verwendeten IBs handelt es sich um Volllysat IBs (WB), die naturgemäß die höchste Sensitivität und Spezifität aufweisen. Damit folgen wir den Empfehlungen des RKIs, das den qualitativen Aspekt bei der Wahl der IBs in Vordergrund stellt.¹

¹ Lyme-Borreliose
RKI-Ratgeber für Ärzte. Aktualisierung vom April 2007. Erstveröffentlichung im
Epidemiologischen Bulletin 22/1999 (www.rki.de/ratgeber)



Während für das Nationale Referenzzentrum für den serologischen Nachweis einer Borrelien-Infektion die Standardisierung der IBs im Vordergrund steht, werden für den serologischen Nachweis einer Borrelien-Infektion vor allem Line Blots mit rekombinanten Antigenen empfohlen.

Diese erreichen nur selten die Qualität von nativen Antigenen, so dass hier eine höhere Zahl an falsch negativen Laborergebnissen zu erwarten ist (siehe Anhang „Qualitative Unterschiede zwischen nativen und rekombinanten Antigenen am Beispiel des OspCs“). Erwartungsgemäß erreichen bei Ringversuchen Testsysteme mit rekombinanten Antigenen die schlechtesten Ergebnisse.²

- **Besonderheiten des Volllysat WBs**

Verfälschung der Ergebnisse durch zu hohe Serumkonzentrationen oder Verlängerung der Inkubationszeit führen im Gegensatz zu einem Line-Blot nicht zu einer höheren Zahl an positiven Banden. Durch unspezifische Reaktionen ist in solchen Fällen der gesamter WB angefärbt und ist somit nicht auswertbar.

Sensitivität der serologischen Testsysteme des DCLs

Eine zuverlässige Beurteilung der Ergebnisse der einzelnen Laboratorien ist kaum möglich. Wird ein und dieselbe Probe von unterschiedlichen Laboratorien untersucht, so können die Ergebnisse zwischen eindeutig negativ und eindeutig positiv variieren.

Die scheinbar hohe Zahl an positiven Befunden im DCL lässt verständlicherweise Zweifel an der Seriosität dieser Ergebnisse aufkommen.

Diese Bedenken sind jedoch unbegründet, wie die folgenden Punkte zeigen:

1. Die von uns verwendeten Tests gehören zu den Testsystemen, die vom RKI und dem NRZ zum serologischen Nachweis einer Borrelien-Infektion empfohlen werden.

2 Bakteriologisch-infektionsserologischer Ringversuch Mai 2005.Zielwertübersicht und Kommentare.Beitrag der Qualitätssicherungskommission der DGHM
Iris Müller, Klaus-Peter Hunfeld und Volker Brade. Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinik Frankfurt am Main. Mikrobiologe, 16. Jg., 4, 2006, S 137 – 142



2. Mit der Einführung des VisE ist die Beurteilung der Sensitivität der IBs indirekt möglich geworden. Anhand der Auswertung von $n = 117$ Proben, bei denen nur die Ergebnisse der IgG IBs gegen B.a. berücksichtigt wurden, betrug unsere Steigerungsrate der positiven Ergebnisse durch das VisE ca. 9,5%. und entspricht damit der in der Literatur für Volllysat IBs gegen B.a. angegebenen Steigerungsrate von ca. 10%.
3. Durch die zusätzlichen Untersuchungen mit IBs gegen B.b. und B.g. konnten wir die Zahl der positiven Ergebnisse weiter steigern. So konnten wir feststellen, dass die Kreuzreagierenden spezifischen Borrelien-Antikörper in den WBs gegen B.a., B.b. und B.g. bei ca. 50,8% der positiven Proben nachweisbar sind ($n = 128$).
4. Wir gehen davon aus, dass die hohe Zahl der seronegativen Borreliose-Fälle u.a. auf die Sensitivität der Testsysteme und fehlende Kreuzreaktionen der Antikörper zurückzuführen ist.

Unsere Studien mit einer auf Borreliose spezialisierten Praxis und einem Universitätsklinikum zeigten, dass mit unseren Tests auch bei seronegativen Borreliose Patienten, die sich in Behandlung befanden, spezifische Ak in den WBs nachweisbar sind.

Persistierende Antikörper oder Hinweis auf eine bestehende Borrelien-Infektion

In Spätstadien einer Borrelien-Infektion ist die serologische Beurteilung einer aktiven Infektion sehr problematisch.

Unsere Interpretation der serologischen Ergebnisse beruht auf einer strikten Einhaltung der Grundlagen der immunologischen Vorgänge, die nach einer erfolgten Infektion stattfinden und die auch für Infektionen mit Borrelien gelten.

So lässt sich aus den serologischen Konstellationen ein Hinweis auf eine Aktivität ableiten.

Bestimmte serologische Konstellationen in Spätstadien einer Borrelien-Infektion lassen eine Unterscheidung zwischen persistierenden Antikörpern und einem Hinweis auf eine bestehende Infektion leider nicht zu.

Entscheidend ist auch hier die klinische Beurteilung denn auch in diesen unklaren Fällen eine Aktivität vorliegen kann.

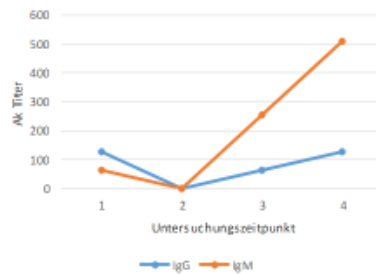
Wie der folgende Fall verdeutlicht, können über Jahre scheinbar persistierende Antikörpertiter auch auf eine bestehende Borrelien-Infektion zurückgeführt werden:



Über einen Zeitraum von ca. einem Jahr konnten wir bei einer Patientin in den IFTs konstant niedrige IgG- und IgM-Ak Titer nachweisen, die somit auf eine Antikörperpersistenz hindeuteten.

Eine stattgefundene Plasmapherese führte erwartungsgemäß zu einer Reduktion der IgG- und IgM-Ak Titer (Ak waren nicht mehr nachweisbar). In der Folgezeit kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der IgG- und IgM-Ak Titer, die auf eine bestehende Borrelien-Infektion hindeuten (siehe Abb.).

Entwicklung der Ak nach der Plasmapherese



Untersuchungszeitpunkte:

1. Vor der Plasmapherese
2. Wenige Tage nach der Plasmapherese
3. Drei Monate nach der Plasmapherese
4. Vier Monate nach der Plasmapherese



Anhang

Informationen zum Borrelien-Testpendel

Die Tests zum Nachweis einer Borrelien-Infektion im DCL bestehen aus:

1. IIFT's zum Nachweis von IgG- und IgM-Ak

Referenzbereich: Titer 1 < 1:100 (IgG); Titer 1 < 1:10 (IgM)

Kreuz Reaktivität: Kreuz Reaktivitäten mit IgG- und IgM-Ak gegen *Treponema pallidum* sind unwahrscheinlich.

Die ermittelte Prävalenz von unter 10% entspricht der üblichen Prävalenz in einem Kollektiv gesund erscheinenden Blutspender.

Kreuzreaktionen zwischen den drei Arten *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* sind die Regel, aber nicht obligatorisch.

Folgende **Antikörperprävalenzen** (IgG: Titer 1:100 oder höher, IgM 1:10 oder höher) wurden bei gesund erscheinenden Blutspendern ermittelt:

| | IgG | IgM |
|--|-------------|-------------|
| <i>Borrelia afzelii</i> | 17% (n=150) | 3% (n=150) |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Schweizer Isolat) | 27% (n=150) | 3% (n=150) |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Amerikanisches Isolat) | 18% (n=150) | 4% (n=150) |
| <i>Borrelia garinii</i> | 23% (n=150) | 4% (n=150) |
| VlsE | 5% (n=201) | - |
| OspC | - | 1,5% (n=68) |

Spezifität und Sensitivität

| Substrat | Spezifität | Sensitivität |
|--|------------|--------------|
| <i>Borrelia afzelii</i> (IgG) | - | 95% |
| <i>Borrelia afzelii</i> (IgM) | - | 80% |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Schweizer Isolat) (IgG) | - | 95% |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Schweizer Isolat) (IgM) | - | 80% |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Amerikanisches Isolat) (IgG) | - | 95% |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. (Amerikanisches Isolat) (IgM) | - | 85% |
| <i>Borrelia garinii</i> (IgG) | - | 100% |
| <i>Borrelia garinii</i> (IgM) | - | 100% |
| VlsE | 93% | 95% |
| OspC | 91% | 100% |



2. WESTERNBLOT (Volllysat) zum Nachweis von IgG- und IgM-Ak

Der Westernblot ist eine qualitative Methode. Der Grenztiter liegt bei einer Verdünnung von 1:51.

Borrelia afzelii

Prävalenzen: Ein Kollektiv aus 115 klinisch definierten Patientenproben und 80 Proben gesund erscheinenden Blutspender wurden mit anti-Borrelia-afzelii Westernblot untersucht.

| Klinisch definierte Seren | Prävalenzen | | |
|---------------------------|-------------|-----|---------|
| | IgG | IgM | IgG/IgM |
| Erythema migrans | 40% | 68% | 80% |
| Neuroborreliose | 78% | 48% | 85% |
| Arthritis | 94% | 15% | 94% |
| Acodermatitis | 100% | 13% | 100% |
| Blutspender | 6% | 3% | |

Borrelia burgdorferi

Prävalenzen: Ein Kollektiv aus 156 klinisch definierten Patientenproben und 517 Proben gesund erscheinenden Blutspender wurden mit anti-Borrelia-burgdorferi Westernblot untersucht.

| Klinisch definierte Seren | Prävalenzen | | |
|---------------------------|-------------|-----|---------|
| | IgG | IgM | IgG/IgM |
| Erythema migrans | 64% | 67% | 84% |
| Neuroborreliose | 85% | 44% | 88% |
| Arthritis | 100% | 30% | 100% |
| Acodermatitis | 83% | 50% | 100% |
| Blutspender | 5% | 4% | |

Borrelia garinii

Prävalenzen: Ein Kollektiv aus 80 klinisch definierten Patientenproben und 60 Proben gesund erscheinenden Blutspender wurden mit anti-Borrelia-garinii Westernblot untersucht.



| Klinisch definierte Seren | Prävalenzen | | |
|---------------------------|-------------|-----|---------|
| | IgG | IgM | IgG/IgM |
| Erythema migrans | 35% | 46% | 69% |
| Neuroborreliose | 81% | 52% | 89% |
| Arthritis | 95% | 14% | 95% |
| Acodermatitis | 100% | 0% | 100% |
| Blutspender | 5% | 5% | |

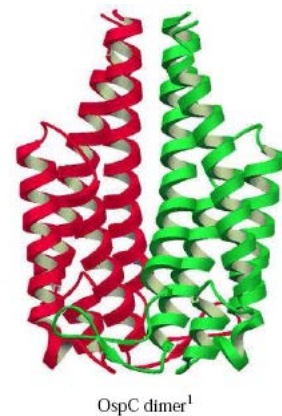
Qualitative Unterschiede zwischen nativen und rekombinanten Antigenen am Beispiel des OspCs

Nicht in jedem kommerziellen Testsystem ist ein gleichsensitives OspC enthalten.

Das native (natürlich vorkommende) OspC besteht aus zwei Monomeren (in der Abb. rot und grün dargestellt), die durch kovalente Bindungen zu einem Dimer verbunden sind.

Die komplizierte Produktion von nativem OspC führt dazu, dass in vielen Testsystemen ein rekombinantes OspC eingesetzt wird. Oft wird dabei eine verkürzte Form exprimiert, so dass nur ein monomeres OspC mit geringer Sensitivität vorliegt.²

Die Bindung der IgM-Ak an ein dimeres bzw. monomeres OspC wird in den graphischen Darstellungen verdeutlicht.



IgM-Ak Bindung an ein dimeres OspC³



IgM-Ak Bindung an monomeres OspC³

In den von uns verwendeten Testsystemen wird das native OspC in dimerer Form eingesetzt.

¹Kumaran et al., 2001, Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*
The EMBO Journal 20 (2001) 971-978

²Probst et al., 2012, N-terminal disulfide-bridging of *Borrelia* outer surface protein C increases its diagnostic and vaccine potentials



Deutsches Chroniker Labor

Ticks and Tick-borne Diseases 3 (2012) 11-17

³Serological diagnosis of Lyme disease, Euroimmun



Kontakt

Deutsches Chroniker Labor GmbH
Ziegeleistr. 3
06485 Quedlinburg/OT Gernrode

Telefon: 039485/668780
Fax: 039485/668779

Geschäftsführer: Marco Haase

Amtsgericht Stendal
Betriebsnummer der BFA: 23453897
HRB: 15086
USt-ID-Nr.: DE276889920