



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin
Lehrstuhl und Institut für Umweltmedizin, UNIKA-T
(Direktorin: Univ.-Prof. Dr. C. Traidl-Hoffmann)

**Etablierung und Validierung einer neuen
durchflusszytometrischen Methode zum Nachweis von
Borrelienantikörpern**

Nikolaos Bounas-Pyrras

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Claudia Traidl-Hoffmann
2. Prof. Dr. Dirk Busch

Die Dissertation wurde am 14.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.12.2016 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Geschichte.....	9
1.2 Erreger der Lyme-Borreliose: <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
1.3 Vektoren und Infektionswege.....	11
1.4 Epidemiologie.....	13
1.5 Klinik	14
1.5.1 Lokalisierte Frühinfektion	15
1.5.2 Disseminierte Frühinfektion	16
1.5.3 Spätstadium mit Organmanifestationen	16
1.6 Diagnostik.....	18
1.6.1 Direkter Erregernachweis	18
1.6.2 Indirekter Erregernachweis	19
1.7 Therapie	21
1.7.1 Therapieempfehlungen bei Lyme-Borreliose	23
2 Zielsetzung.....	25
3 Material und Methoden	27
3.1 LineBlot-Verfahren	27
3.1.1 Auswertung der LineBlots	31
3.2 SERION Multianalyt™ <i>Borrelia burgdorferi</i> IgG und IgM.....	32
3.2.1 Partikelbasierter Fluoreszenzimmunoassay zum Nachweis von humanen Antikörpern gegen <i>Borrelia burgdorferi</i>	32
3.2.2 Durchflusszytometrie	34
3.3 Chemikalien, Lösungen, Geräte	35
3.3.1 Probengewinnung	35
3.3.2 Verwendete Chemikalien.....	35
3.3.3 Verwendete Geräte.....	36
3.3.4 Verwendete Materialien	37
3.4 Methoden	37
3.4.1 Probenverdünnung.....	37
3.4.2 Präparation der Messplatte.....	38
3.4.3 Messung im Durchflusszytometer	39

Inhaltsverzeichnis

3.4.4 Auswertung der Messdaten.....	42
3.4.5 Auswertung der Antikörpertiter.....	43
3.4.6 Testgültigkeitskriterien.....	45
3.5 Vergleich der Messwerte mit etablierten Methoden	45
3.5.1 Zusammensetzung der Proben und Patienten	46
4 Ergebnisse.....	48
4.1 Interpretation der Ergebnisse	48
4.2 Kohorte.....	48
4.2.1 Patientengruppen.....	49
4.2.2 Serologischer Test ohne Assoziation zu Zeckenbiss:.....	52
4.2.3 Mit Zeckenbiss assoziierte atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss:	52
4.3 Serologische Ergebnisse im Vergleich.....	54
4.3.1 Kompletter Serensatz: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	54
4.3.2 Kompletter Serensatz: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	54
4.3.3 Kompletter Serensatz: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG.....	55
4.3.4 Kompletter Serensatz: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	56
4.3.5 Kompletter Serensatz: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	57
4.3.6 Kompletter Serensatz: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM.....	58
4.3.7 Frühinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	59
4.3.8 Frühinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	59
4.3.9 Frühinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot- IgG-Ergebnissen.....	60
4.3.10 Frühinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	61
4.3.11 Frühinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	62
4.3.12 Frühinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot- IgM-Ergebnissen.....	63
4.3.13 ECM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen	63
4.3.14 ECM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen	64

4.3.15 ECM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	65
4.3.16 ECM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	66
4.3.17 ECM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	67
4.3.18 ECM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	68
4.3.19 MEM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen	68
4.3.20 MEM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen	69
4.3.21 MEM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	70
4.3.22 MEM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	71
4.3.23 MEM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	72
4.3.24 MEM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	72
4.3.25 Lymphozytom: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	73
4.3.26 Lymphozytom: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	74
4.3.27 Lymphozytom: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	75
4.3.28 Lymphozytom: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	76
4.3.29 Lymphozytom: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	76
4.3.30 Lymphozytom: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	77
4.3.31 Spätinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	78
4.3.32 Spätinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	79
4.3.33 Spätinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	80
4.3.34 Spätinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	81
4.3.35 Spätinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	82

4.3.36 Spätinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	83
4.3.37 Neuroborreliose: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	84
4.3.38 Neuroborreliose: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	84
4.3.39 Neuroborreliose: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	85
4.3.40 Neuroborreliose: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	86
4.3.41 Neuroborreliose: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	87
4.3.42 Neuroborreliose: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	87
4.3.43 ACA: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	88
4.3.44 ACA: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	89
4.3.45 ACA: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	89
4.3.46 ACA: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	90
4.3.47 ACA: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	91
4.3.48 ACA: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	92
4.3.49 Lyme-Arthritis: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	92
4.3.50 Lyme-Arthritis: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	93
4.3.51 Lyme-Arthritis: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen.....	94
4.3.52 Lyme-Arthritis: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	95
4.3.53 Lyme-Arthritis: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen.....	96
4.3.54 Lyme-Arthritis: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	97
4.3.55 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	98
4.3.56 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen.....	98

Inhaltsverzeichnis

4.3.57	Atypische, anderweitige Diagnosen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen	99
4.3.58	Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	100
4.3.59	Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen	101
4.3.60	Atypische, anderweitige Diagnosen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen.....	102
5	Diskussion	104
5.1	Kompletter Serensatz	104
5.1.1	IgG	104
5.1.2	IgM	107
5.2	Kongruenz der negativen Ergebnisse.....	109
5.3	Frühinfektionen – Sensitivität	110
5.3.1	IgG	110
5.3.2	IgM	112
5.4	Spätinfektionen – Sensitivität	114
5.4.1	IgG	114
5.4.2	IgM	116
5.5	Atypische, anderweitige Diagnosen – Sensitivität	118
5.5.1	IgG	118
5.5.2	IgM	120
5.6	Auswertungsunterschiede der beiden Methoden.....	122
5.6.1	Interpretation der Gesamtergebnisse – IgG-Reihe.....	122
5.6.2	Interpretation der einzelnen Antikörperergebnisse – IgG-Reihe	123
5.6.3	Interpretation der Ergebnisse – IgM-Reihe.....	123
5.6.4	Darstellung der Ergebnisse	124
5.7	Einsatz der diagnostischen Methoden zur serologischen Verlaufskontrolle	127
5.8	Verbesserungen in der praktischen Testdurchführung.....	127
6	Zusammenfassung.....	129
7	Literaturverzeichnis	132
8	Danksagung.....	151

Abkürzungsverzeichnis

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
d	Tag
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Erythema chronicum migrans
EIA	Enzym immunosorbent assay
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
EM	Erythema migrans
EW	Einwohner
HV	Hautveränderung
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
LA	Lyme-Arthritis
LB	Lyme-Borreliose
Max.	Maximum
MEM	multiple Erythemata migrantia
Mio.	Million
MIQ	Mikrobiologisch-Infektiologischer Qualitätsstandard
NB	Neuroborreliose
OD	Optische Dichte
Osp	Outer-surface-protein
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p.o.	per os
SD	Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

TAB	Tabelle
WB	Westernblot
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Geschichte

Der Name Lyme-Borreliose leitet sich von der amerikanischen Stadt Lyme in Connecticut ab, in der 1975 mehrere Fälle einer „idiopathischen juvenilen Arthritis“ auffielen. Dr. Allen C. Steere, ein Rheumatologe der Yale University, beschrieb zwei Jahre später aufgrund klinischer und epidemiologischer Untersuchungen eine unbekannte Form endemischer Arthritis namens Lyme-Arthritis (Steere et al., 1977).

Im Jahr 1982 wurden die krankheitserregenden Spirochäten aus Zecken der Gattung *Ixodes ricinus* von W. Burgdorfer und seiner Arbeitsgruppe isoliert, als solche erkannt und folglich nach ihm als *Borrelia burgdorferi* benannt (Burgdorfer et al., 1982). Die Isolierung der Erreger fand später aus dem Blut (Benach et al., 1983), Liquor (Preac-Mursic et al., 1984) und Hautbiopsien aus mit Erythema chronicum migrans und Acrodermatitis chronica atrophicans befallenen Arealen (Steere et al., 1984b, Asbrink et al., 1985) statt. Die erste Beschreibung der Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) erfolgte durch Buchwald 1883, damals beschrieben als ein „Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie“ (Buchwald 1883). Der Name ACA wurde von Herxheimer 1902 etabliert (Herxheimer et al., 1902). Als erste erfolgreiche Therapie der ACA wurde die Gabe von Penicillin 1946 indiziert, welche auch die infektiöse Ursache der Erkrankung bekämpfte (Svartz, 1946).

Die Assoziation zwischen dem Erythema migrans und einem Zeckenstich wurde zuerst von Afzelius 1909 auf dem schwedischen Dermatologenkongress präsentiert (Afzelius, 1910). Das Erythema chronicum migrans wurde vier Jahre später von Lipschütz beschrieben (Lipschütz, 1913). Als weiteres Symptom der Frühborreliose wurde die Lymphadenosis cutis benigna von Bäfverstedt 1943 entdeckt und analysiert (Bäfverstedt, 1943). Aufgrund seiner weitreichenden Arbeit wurde das Komplettbild des Bannwarth-Syndroms mit der lymphozytären Meningitis, schmerzhaften Radikulitis und Hirnnervenausfällen zu Ehren des Münchner Neurologen Bannwarth nach ihm benannt (Bannwarth, 1941).

1.2 Erreger der Lyme-Borreliose: *Borrelia burgdorferi*

Borrelien gehören zur Familie der *Spirochaetaceae* in der Ordnung *Spirochaetales*. Diese Ordnung wird in zwei Gattungen unterteilt, die *Leptospiraceae* und die *Spirochaetaceae*. Von dieser Familie leiten sich die Gattungen *Treponema*, mit dem klinisch bekanntesten Beispiel des Erregers der Syphilis (*Treponema pallidum*), *Borrelia* und *Christispira*, ab.

Vom Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, wurden in Europa bisher vier humanpathogene Genospezies entdeckt, darunter *Borrelia afzelii*, gefolgt von *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* und *B. spielmanii*. Insgesamt können mithilfe von molekulargenetischen Untersuchungsmethoden 13 Genospezies von *Borrelia burgdorferi* unterschieden werden: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia japonica*, *Borrelia garinii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia sinica*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdae*, *Borrelia bavariensis* und *Borrelia valaisiana*.

Borrelia burgdorferi sind mikroaerophile, gramnegative und gewundene Schraubenbakterien mit einer Amplitude von 2-4 µm. Ihre Länge liegt im Bereich von 8-30 µm und sie haben einen Durchmesser von 0,2-0,3 µm (Burgdorfer et al., 1983). Wegen dieser Charakteristika sind sie mikroskopisch nur im nativen Dunkelfeld darstellbar. Die Spirochäten werden von einer 2-10 nm dicken, mukoiden Außenmembran begrenzt, der eine trilaminare Membran unterliegt. Diese schließt den protoplasmatischen Zylinder ein. Borrelien sind weiterhin durch ihre Endflagellen gekennzeichnet, welche im periplasmatischen Raum liegen und an ihrer gegenüberliegenden Zellmembran haften (Barbour et al., 1986; Wang et al., 2001), mithilfe dessen sich diese aktiv im Raum bewegen können. Auf ihrer Oberfläche tragen sie verschiedene Proteine, unter anderem die Outer-surface-Proteine (Osp, A, B, C, D, E, F), VlsE (variable major protein-like sequence expressed) und das 60kDa-Antigen, welches ein Hitzeschockprotein ist (Steere, A.C., 2001; Singh et al., 2004). Die Funktion dieser liegt in der Interaktion mit den Wirtszellen und der Anpassung der Borrelien auf die verschiedenen Wirtsorganismen (Steere, A.C., 2001). Sie stellen aber auch Angriffsziele für das menschliche Immunsystem dar. Darüber hinaus finden sich im Zellplasma ein lineares Chromosom mit ungefähr

950.000 Nukleotiden, bis zu neun zirkuläre und zwölf lineare Plasmide (Casjens et al., 2000; Fraser et al., 1997). In den extrachromosomal gelegenen Plasmiden liegen insbesondere die kodierenden Gene für die Outer-surface-Proteine. Die Kodierung für Outer-surface-Proteine nimmt den größten Teil des Genoms ein, sodass Borrelien nur wenige Enzyme selbst bilden können, was ihre parasitäre Existenz erklärt (Singh et al., 2004).

Bei den humanpathogenen Spezies fällt eine geografische Differenzierung auf: In Europa werden Krankheitsfälle von den Familien der *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia spielmanii* und *Borrelia valaisiana* hervorgerufen. Für Fälle in Nordamerika ist ausschließlich *Borrelia burgdorferi sensu stricto* verantwortlich. Darüber hinaus assoziieren sich die verschiedenen Borrelien-Spezies mit unterschiedlichen Symptomen. So bewirkt *Borrelia burgdorferi sensu stricto* Erythema migrans und Arthritiden. Ähnlich verursacht *Borrelia afzelii* im Frühstadium auch Erythema migrans, löst jedoch im Spätstadium die Acrodermatitis chronica atrophicans aus. Die in Europa typische Spezies *Borrelia garinii* ruft die Neuroborreliose hervor, wobei *Borrelia spielmanii* und *Borrelia valaisiana* jeweils für Erythema migrans verantwortlich sind (Richter et al., 2004; Wang et al., 1997). Aufgrund der unterschiedlichen membranständigen Lipoproteine, der sogenannten Outer-surface-Proteine (Osp), können die Borrelien-Stämme in sieben OspA- und 13 OspC-Serotypen unterteilt werden (Barbour et al., 1984; Wilske et al., 1988), wobei alle Subspezies als *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Wang et al., 1999) oder *Borrelia-burgdorferi-Komplex* zusammengefasst werden.

Die verschiedenen Spezies sind zudem für unterschiedliche klinische Manifestationen der Lyme-Borreliose verantwortlich. Die für den nordamerikanischen Raum typische Spezies *B. burgdorferi sensu stricto* ist mit der Arthritis und Neuroborreliose assoziiert, wobei die neurologische Manifestation der Borreliose auch von *B. garinii* hervorgerufen wird (Balmelli und Piffaretti, 1995). *B. afzelii* wird gehäuft bei Hautmanifestation gefunden (Wienecke, 1993; Strle, 1995).

1.3 Vektoren und Infektionswege

Die Borreliose ist eine Zoonose, die durch Zecken der Gattung *Ixodes* (Schildzecken) vom Tier auf den Menschen übertragen wird. Im Fall der Borreliose gehören zu den

Einleitung

wichtigsten Vertretern dieser Gattung die Spezies *I. ricinus* (gemeiner Holzbock), *I. scapularis* (Hirschzecke), *I. persulcatus* und *I. pacificus* (Singh et al., 2004). In Europa sind hauptsächlich *I. ricinus* und in Nordamerika *I. scapularis* vorhanden. Spirochäten wurden auch in der Hundezecke *Dermacentor variabilis* und *Amblyomma americanum* gefunden (Anderson et al., 1985; Schulze et al., 1984), jedoch gab es noch keine Fälle einer Übertragung auf den Menschen. Mäuse und andere Nagetiere bilden das Erregerreservoir der Borrelien, da diese in ihnen auch jahrelang überleben können. Dabei ist es möglich, dass Vögel die infizierten Schildzecken in andere Regionen verschleppen, wobei Tiere in entfernteren Orten infiziert werden können (Anderson et al., 1986).

Die Entwicklung der Zecke unterteilt sich in vier Stadien: dem Ei-, Larven-, Nymphen- und adulten Stadium. Die Lebenserwartung liegt bei etwa zwei Jahren, wobei in jedem Stadium jeweils einmal Blut gesaugt wird (Singh et al., 2004). Während dieser Blutmahlzeiten infiziert sich die Schildzecke mit den Borrelien. Die Spirochäten verweilen im Mitteldarm des Wirts, bis sie bei dem nächsten Saugakt den Darm penetrieren und zur Speicheldrüse wandern.

Hierbei gibt es für die parasitäre Aktivität zwei Hauptphasen im Jahr: Frühjahr (April-Mai) und Herbst (August-Oktober). Ihre Opfer findet die Zecke mithilfe des Haller'schen Sinnesorgans, das den Wirt über thermische (Hautwärme), mechanische (Erschütterungen) und chemische Reize (CO₂ in der Atemluft und Buttersäure im Schweiß des Wirtes) detektiert. Beim Stechen hakt sich die Zecke mit ihrem Hypostom, welches Widerhaken enthält, und einer zementartigen Substanz in der Haut fest. Der Speichel der Zecken beinhaltet anästhesierende, entzündungs- und blutgerinnungshemmende Inhaltsstoffe (Ribeiro et al., 1985, 1990; Ribeiro, 1987), welche den Stich anfangs unbemerkt lassen.

Für die Infektion des Menschen mit Borrelien sind besonders die Nymphen verantwortlich. Obwohl die Nymphen mit einer Durchseuchungsrate von circa 13 % weniger betroffen sind als die adulten Zecken mit 22-35 % (Strle et al., 1995), sind sie besonders im Frühjahr und im Sommer aktiv, Jahreszeiten, zu denen sich die Menschen oft im Freien und in Waldgebieten aufhalten (Hengge et al., 2003). Zudem werden ihre Bisse aufgrund der geringeren Größe der Nymphen nicht so oft wahrgenommen (Hengge et al., 2003).

Die Übertragung der Borrelien findet während des Saugakts statt, wobei die Spirochäten vom Darm der Zecke zur Speicheldrüse wandern müssen. Dieser Prozess dauert an,

sodass sie über den Speichel nach 1-3 Tagen (Burgdorfer et al., 1988, 1991) in den menschlichen Körper gelangen. Die Entfernung der Zecke sollte deshalb innerhalb der ersten zwölf Stunden erfolgen (Singh et al., 2004). Ein alternativer Weg der Übertragung, bei längerer Saugzeit (3-7 Tage), ist die Regurgitation, bei der die Bakterien aus dem Darm direkt übertragen werden (Piesmann et al., 1987; Duray, 1989; Burgdorfer et al., 1988, 1991).

1.4 Epidemiologie

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragbare Krankheit in der nördlichen Hemisphäre (Lünemann und Krause 2004), kommt jedoch nicht in der Südhalbkugel vor (Hengge et al., 2003; Wilske und Fingerle, 2005). Da die Infektionsrate mit dem Vorkommen der Vektoren assoziiert ist, sind die Schwerpunkte in Europa die Waldgebiete Deutschlands, Skandinaviens, Österreichs, Sloweniens und Schwedens (Hengge et al., 2003). Die am stärksten betroffenen Gebiete in Nordamerika sind im Nordosten (Maine bis Maryland), im mittleren Westen (Minnesota und Wisconsin) und an der Westküste (Kalifornien und Oregon). Grund für diese Verteilung ist die Existenz von *Ixodes scapularis* im Osten und mittleren Westen und *Ixodes pacificus* im Westen der Staaten (Pavia, 2003).

In Europa wird die Inzidenz auf 50-150/100.000 Einwohner angegeben, wobei es, wie erwähnt, regionale Unterschiede gibt (Berglund et al., 1995; Hofmann, 2005). Erhöhte Inzidenzen wurden bei bevölkerungsbezogenen Studien in verschiedenen Regionen beobachtet: 8 % in Berlin (Lange, 1993), in Bayern 15 % (Reimer et al., 1999) und in Baden-Württemberg 16,9 % (Hassler et al., 1992). Da es in Deutschland eine Meldepflicht für Diagnosen der Lyme-Borreliose nur in Bayern, Berlin, Rheinland-Pfalz, dem Saarland und den neuen Bundesländern gibt, existieren nur wenige epidemiologische Daten bezüglich der Inzidenz. 0,5 % der deutschen Bevölkerung infizieren sich jedes Jahr neu (Huppertz et al., 1999; Reimers et al., 1992), wobei diese Rate bei Personen, die sich häufig in Waldgebieten aufhalten, wie z. B. Forstarbeiter und Orientierungsläufer, bei 1,5-2 % liegt (Fahrer et al., 1991; Hofmann, 1991; Reimer et al., 1999). Jedoch ist eine erhöhte Exposition nicht für ein höheres Erkrankungsrisiko verantwortlich (Hofmann 1991; Reimer et al., 2002).

1.5 Klinik

In Europa gilt die Lyme-Borreliose als die häufigste von den Schildzecken *Ixodes ricinus* übertragene Infektionserkrankung. Aufgrund der verschiedenen Krankheitsmanifestationen kann die Lyme-Borreliose in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden (Asbrink und Hovmark, 1988, Steere et al., 1984a, Steere, 1989). Die Patienten können symptomfreie Intervalle, aber auch durchgehende Übergänge zwischen den verschiedenen Stadien aufweisen. Sie kann grob in eine Frühmanifestation (lokalisierte Frühinfektion und disseminierte Frühinfektion) und eine Spätmanifestation (Spätstadium mit Organmanifestation) unterteilt werden. Häufig fällt die Infektion zuerst durch eine topische Rötung mit zentraler Blässe auf, die als Erythema migrans bezeichnet wird. Jedoch begrenzt sich die Infektion nicht nur auf die Haut, sodass die Borrelien sich unter anderem auch in die Gelenke und in das zentrale und das periphere Nervensystem ausbreiten können. Das Spektrum der klinischen Symptomatik ist somit sehr breit (Fahrer et al., 1988; Nohlmans et al., 1991), wobei auch viele Borreliosefälle klinisch asymptomatisch und dadurch unerkant bleiben (Huppertz, 2001).

Tabelle 1.5-1: Klinisches Spektrum der Lyme-Borreliose

Lokalisierte Frühinfektion	<ul style="list-style-type: none">• Allgemeinsymptome: Kopfschmerzen, Müdigkeit, Grippesymptomatik, Fieber, Arthralgien, Myalgien, regionale, generalisierte Lymphadenopathie• Erythema migrans (EM)• Lymphadenosis benigna cutis
Disseminierte Frühinfektion	<ul style="list-style-type: none">• Multiple Erythemata migrantia (MEM)• Meningo-Radikulo-Neuritis-Bannwarth• Uveitis, Chorioretinitis• Endo-/Myo-/Perikarditis
Spätstadium mit Organmanifestationen	<ul style="list-style-type: none">• Neuroborreliose• Acrodermatitis chronica atrophicans• Lyme-Arthritis

1.5.1 Lokalisierte Frühinfektion

1.5.1.1 *Erythema (chronicum) migrans*

Das Erythema (chronicum) migrans ist oft das erste Symptom einer Borrelieninfektion und tritt bei 13-72 % der Borreliose-Erkrankten auf (Petersen et al., 1989; Wilske et al., 1989), kann sich jedoch bei 25 % der Infizierten im Frühstadium auch nicht ausbilden (Nadelman et al., 1998). Nach einer Inkubationszeit von 3-20 Tagen bildet sich an der Stelle des Zeckenstichs eine rote Papel, die sich im Verlauf zu einer scharf begrenzten Rötung mit zentraler Blässe und zentrifugaler Ausbreitung verändert, wobei als Maßstab ein Durchmesser von mindestens 5 cm gesetzt wird (Hofmann 2009). Begleitende Symptome wie lokale Hyperthermie, Kribbelparästhesien, Pruritus und brennende Schmerzen können ebenfalls auftreten. Meistens wird das EM von Fieber (39 %), Fatigue (54 %), Kopfschmerzen (42 %), Arthralgien (44 %), Myalgien (44 %) und regionaler Lymphadenopathie (23 %) begleitet (Singh et al., 2004). Diese Symptome sind jedoch kein Anzeichen für eine Dissemination der Borrelien im Körper (Mulleger, 2004). Das wichtigste Kriterium für die Diagnose eines EM ist auch heutzutage noch das klinische Bild (Wilske et al., 2000). In vielen Fällen verschwindet das Erythema migrans ohne Therapie nach 3-4 Wochen, kann sich jedoch an derselben oder an anderen Stellen wieder bilden (Schwarzenbach et al., 1999). Bleibt das Erythem ohne Therapie über vier Wochen bestehen, so bezeichnet man es als Erythema chronicum migrans (ECM) (Hofmann 1991).

1.5.1.2 *Lymphadenosis benigna cutis*

Die Lymphadenosis benigna cutis beschreibt sich als 2-4 cm große, noduläre Hautveränderung, die besonders am Ohrläppchen, den Mamillen und der Genitalregion zu finden ist. Sie bildet sich in den ersten beiden Monaten der Infektion aus, wird aber nur bei 2 % der Patienten beobachtet (Huppertz, 1999). Sie ist die Folge einer Überreaktion von B- und T-Zellen auf Borrelienantigene, wobei im histologischen Schnitt eine dichte Infiltration von Histiocyten und Lymphozyten beschrieben wird. In diesen Pseudolymphomen können *B. burgdorferi sensu lato*, *B. afzelii* (Hovmark et al., 1986), B- und T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

1.5.2 Disseminierte Frühinfektion

Als disseminierte Frühinfektion wird das zweite Stadium der Lyme-Borreliose bezeichnet, das sich bei hämatogener Aussaat hauptsächlich in der Haut und im Nervensystem ausbildet. Zeichen dieses Stadiums fallen Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich auf (Nau et al., 2009). Charakteristisch für die frühe Neuroborreliose ist die Meningo-Radikulo-Neuritis Bannwarth, bei der sich die peripheren Nerven, deren Wurzeln und auch Gehirnnerven schmerzhaft entzünden. Besonders betroffen sind der Schultergürtel und Lumbalbereich mit Ausstrahlung in die jeweiligen Extremitäten. Wolfgang Kristoferitsch wies in seiner Arbeit „Neurological manifestations of Lyme borreliosis“ darauf hin, dass beim Stich in die untere Extremität die zugehörigen ipsilateralen Nervenwurzeln besonders gefährdet sind (Kristoferitsch, 1991). Neben den radikulitischen Schmerzen sind bei 30-50 % aller Patienten zusätzliche Hirnnervenausfälle nachweisbar (Oschmann et al., 1998). Die disseminierte Frühinfektion ist weiterhin gekennzeichnet durch ein allgemeines Krankheitsgefühl mit leichtem Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen.

Darüber hinaus kann die Disseminierung durch multiple Erythemata migrantia (MEM), am Körper verteilt, auffallen.

1.5.3 Spätstadium mit Organmanifestationen

Das dritte Stadium, das der Spätinfektion, tritt gewöhnlich Monate bis Jahre nach der Ansteckung auf (Nau et al., 2009). Typische Erkrankungen für dieses Stadium umfassen die Neuroborreliose, die Acrodermatitis chronica atrophicans und die Lyme-Arthritis.

1.5.3.1 Neuroborreliose

Die Definition der Neuroborreliose beinhaltet mehrere Krankheitsbilder, die von eher milderen Symptomen wie Kopfschmerzen, leichteren kognitiven Beeinträchtigungen (Lyme-Enzephalopathie), Müdigkeit, Radikulitiden und Neuralgien (Halperin et al., 1987, 1989; Logigian et al., 1990, 1992) bis hin zu schwerwiegenderen wie zum Beispiel der chronischen Enzephalomyelitis mit Paresenscheinungen, psychischen Veränderungen oder Demenz (Kristoferitsch, 1991; Pfister et al., 2006) reichen. Darüber hinaus können auch die Hirnnerven betroffen sein, unter anderem der N. abducens, N.

opticus, N. oculomotorius, N. trochlearis, N. trigeminus, die Hirnnerven IX-XII und seltener der N. vestibulocohlearis. Es gibt Hinweise auf geografische Unterschiede bezüglich des Auftretens von isolierten Polyneuropathien ohne weitere typische Symptome der Lyme-Borreliose zwischen den USA und Europa. Dabei wurden diese bei amerikanischen Patienten nachgewiesen, konnten bei europäischen Patienten aber nicht beobachtet werden (Halperin et al., 1990; Logigian et al., 1999). In den meisten Fällen treten alle genannten Symptome isoliert auf, wobei auch Fälle kombinierten Bestehens möglich sind. Die Polyneuritis/Polyradikulitis ist bei europäischen Patienten sehr oft mit der kutanen Manifestation der Borrelieninfektion namens Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) assoziiert (Hopf, 1975).

1.5.3.2 Acrodermatitis chronica atrophicans

Die Acrodermatitis chronica atrophicans, die bekannteste kutane Manifestation der Spätborreliose, wurde zum ersten Mal 1902 von Herxheimer und Hartmann beschrieben. Sie stellt sich als ödematöse, entzündliche Schwellung mit rötlichen Verfärbungen der Haut dar, insbesondere an einseitigen Stellen der distalen Streckseiten der Extremitäten, jedoch ist auch eine Manifestation beidseitig oder auch im Gesicht möglich (Hofmann, 2005). Die befallene Haut kann im späteren Verlauf atrophisch dünner werden, wobei die Behaarung und livide Verfärbung langsam verschwinden. Aufgrund des klinischen Bildes kann die ACA oft mit Lupus erythematodes, Altersatrophie der Haut, Akrozyanose oder chronisch venöser Insuffizienz verwechselt werden. Histologisch fallen neben der Epidermis- und Bindegewebsatrophie ein perivaskuläres, plasmazellreiches Infiltrat und juxtaartikuläre fibroide Knötchen auf (Hofmann, 2005). Bei 50 % der Patienten wird zudem eine zusätzliche periphere Neuropathie beobachtet, die von Parästhesien, brennenden Schmerzen, insbesondere nachts, Arthralgien und Pruritus gekennzeichnet ist (Kristoferitsch et al., 1988). In Nordamerika werden bei Borrelioseinfektionen keine Fälle von ACA beobachtet, eine Tatsache, die mit der Assoziation von manchen Borrelien-Subspezies mit bestimmten Symptomen zusammenhängt. In diesem Fall wurde eine Verbindung zwischen der Subspezies *Borrelia afzelii* (OspA-Serotyp 2) und der Acrodermatitis chronica atrophicans entdeckt (Canica et al., 1993; Wilske et al., 1993).

1.5.3.3 Lyme-Arthritis

Bei der Lyme-Arthritis handelt es sich um eine Mono- oder Oligoarthritis, die sich bevorzugt an dem Kniegelenk und anderen großen Gelenken der Extremitäten manifestiert und in Schüben verläuft. Fälle, bei denen die Entzündung das Temporomandibulargelenk betraf, sind ebenfalls beschrieben worden (Wilske et Fingerle, 2005). Die Gelenke zeigen sich geschwollen, überwärmt und werden meistens von Schmerzen geringer Intensität betroffen. In Deutschland sind 8-10 % der Borreliosekranken von der Lyme-Arthritis betroffen (Herzer, 1988), wohingegen in den USA vor 20 Jahren 60 % und heutzutage weniger als 10 % diese Symptome aufweisen. Der signifikante Rückgang dieser Inzidenz ist wahrscheinlich mit der früheren Erkennung und Therapie der Lyme-Borreliose zu erklären (Wormser et al., 2006). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass bis zu 90 % der Lyme-Arthritiden nach erfolgter antibiotischer Therapie ausheilen (Christen et al., 1993; Herzer, 1991; Herzer et al., 1986), wobei die Symptome bei den übrigen 10 % persistieren und Immunreaktionen in der Synovia als Folge haben. Steere beschrieb in seiner Arbeit 1990 einen Zusammenhang zwischen den HLA-Subtypen DR2 oder DR4 und der Ausprägung einer therapierefraktären Lyme-Arthritis (Steere et al., 1990).

1.6 Diagnostik

Die Diagnose der Lyme-Borreliose wird mithilfe des klinischen Bildes und verschiedener direkter und indirekter Laboruntersuchungen gestellt. Zu den momentan etablierten direkten Nachweisverfahren gehören die Kultur und die Polymerasekettenreaktion (PCR) und zu den indirekten Nachweisverfahren der Antikörpernachweis mittels ELISA und Westernblot. Für diese Tests können verschiedene Patientenmaterialien genutzt werden, unter anderem Haut-, Plasma-, Liquorproben sowie auch Gelenkflüssigkeit und Synovialgewebe.

1.6.1 Direkter Erregernachweis

B. burgdorferi kann direkt durch Anzucht nachgewiesen werden, auch wenn diese Methode wegen des hohen Aufwandes, der langen Nachweiszeit und der hohen Kosten

selten angewendet wird. Die Kultur erfolgt auf BSK-Medium (Barbour-Stoenner-Kelly) (Kelly, 1971; Stoenner et al., 1982; Barbour et al., 1984), weshalb ein Zeitraum von drei Tagen (Mitchell et al., 1993) bis mehreren Monaten (Schwartz et al., 1993) benötigt wird. Die Anzucht erfolgt optimalerweise aus Hautbiopsien oder ACA-Läsion (Picken et al., 1998; Asbrink und Hovmark, 1985; Zore et al., 2002) bei 32 °C mit einem antimykotischen und antibiotischen Zusatz, um Verfälschungen durch die Standardflora zu vermeiden (Berger et al., 1992; Kuiper et al., 1994). Außer den genannten Materialien können auch Plasma-, Liquorproben und Gelenkflüssigkeit als Kulturquelle genutzt werden, wobei die besten Detektionsraten mit 50-70 % bei Proben aus der Haut und ACA-Läsionen bestehen. Die nächsthöhere Detektionsrate (10-30 %) besteht bei Liquorproben von Patienten mit Neuroborreliose oder Bannwarth-Syndrom (Wilske und Fingerle 2005; Pfister und Rupprecht, 2006; Nau, Christen und Eiffert, 2009). Die höchste Sensitivität besitzt der Erregernachweis im Frühstadium der Lyme-Borreliose (57-86 %), weshalb er auch zuverlässige Ergebnisse bei atypischem Erythema migrans bieten kann (Feder et al., 2006; Steere, 2001; Singh et al., 2004; Hengge et al., 2003; Wilske et al., 2005). In allen anderen Fällen und Stadien liegt die Sensitivität für Hautbiopsien bei 30-70 % (Asbrink et al., 1985) und für Liquor erreicht sie nicht die 5 % (Karlsson et al., 1990). Eine negative Kultur stellt somit keine definitive negative Diagnose dar, weshalb andere Methoden zur Sicherung angewendet werden müssen.

Die zweite Methode des direkten Erregernachweises ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Bei dieser kann Borrelien-DNA aus Hautbiopsaten und Gelenkpunktaten nachgewiesen werden. Die Sensitivität dieser Nachweismethode ist bei frühen Stadien der Infektion mit 88 % höher als bei der Kultur, nimmt jedoch mit dem Verlauf der Krankheit stetig ab (Brettschneider et al., 1998; Schwartz et al., 1992). Kritik an der PCR ist dahingehend auszudrücken, dass nur die DNA der Borrelien und nicht der Erreger an sich nachgewiesen wird, sodass auch nach erfolgreicher Therapie ein positives Ergebnis vorliegen kann (Frossard et al., 1999).

1.6.2 Indirekter Erregernachweis

In der Routinediagnostik werden hauptsächlich zwei Verfahren zur Detektion von Antikörpern eingesetzt: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Westernblot. Diese serologischen Tests messen die IgG- und IgM-Antikörper in den Körperflüssigkeiten der Patienten und können somit nur indirekt wiedergeben, ob es eine

Einleitung

Infektion gegeben hat oder diese weiterhin besteht. Dieses System wurde in Europa vom Mikrobiologisch-Infektiologischen Qualitätsstandard 12 (MIQ 12) und in den USA vom Center for Disease Control (CDC) festgelegt (CDC 1994; Wilske et al., 2000).

Beim ELISA werden auf einer Mikrotiterplatte das Patientenserum mit Antigenhomogenat gemischt, welche einen Antigen-Antikörper-Komplex als Ergebnis haben. Durch Zusatz von enzymmarkiertem Anti-human-IgG und -IgM entsteht ein Substrat, das einen photometrisch messbaren Farbumschlag aufweist.

Das Prinzip des Westernblots liegt in der elektrophoretischen Auftrennung verschiedener Proteinfractionen und Übertragung dieser auf eine Nitrozelluloseacetatfolie. Dabei werden fertig hergestellte Teststreifen eingesetzt, die mit dem Patientenserum, das die gesuchten Antikörper enthält, beimpft werden. Die IgG- oder IgM-Antikörper binden an ihren entsprechenden (auf dem Immunoblot befindlichen) Borrelienproteinen. Im nächsten Schritt werden enzymgekoppelte Anti-human-IgG oder -IgM und ein enzyspezifisches Substrat hinzugefügt, sodass der ganze Antikörperkomplex angefärbt wird. Die dadurch entstehenden Banden stehen mit ihrer Dicke quantitativ für die Antikörpermenge im Patientenserum.

Das Testverfahren ist als doppelstufiges System aufgebaut (Wilske et al., 2000), bei dem zuerst ein ELISA als Suchtest eingesetzt wird (Krause et al., 2005; Lencakova et al., 2008). Bei positivem oder grenzwertigem Ergebnis wird als zweite Stufe ein Westernblot als Bestätigungstest durchgeführt (Wormser 2006; Pfister et al., 2006). Weniger von praktischer, aber eher von historischer Bedeutung ist der Immunfluoreszenz-Test (IFT), der anstelle des ELISA eingesetzt (Barbour, 1988), jedoch wegen der simpleren Durchführung und der höheren Sensitivität von der zweiten Methode ersetzt wurde (Pavia, 2003; Lencakova et al., 2008). Bei einem negativen Suchtest wird der Bestätigungstest nicht durchgeführt, da eine Borreliose mit dem ELISA schon ausgeschlossen werden kann. Hierbei muss man aber auch die Möglichkeit einer sehr frühen Infektion in Betracht ziehen, da bei einer solchen noch keine Antikörper gebildet sind und der Test somit negativ ausfällt. Erst durch einen Anstieg der IgM-Antikörper unter Antibiose lassen sich solche Phasen der Infektion mit den genannten Methoden nachweisen (Hofmann, 1996).

Ein ELISA wird dann als falsch-positiv gewertet, wenn der folgende Westernblot negativ ausfällt (Hengge et al., 2003) und der Bestätigungstest eine Spezifität von über 95 % aufweisen kann (Wilske et al., 2005). Ein Grund für falsch-positive Ergebnisse sind oft

Einleitung

andere Infektionserkrankungen, wie z. B. Lues oder Rückfallfieber und Autoimmunerkrankungen, sodass diese in Betracht gezogen werden müssen (Wilske et al., 1990). Mit späterem Verlauf der Infektion steigt auch die Rate der positiv nachweisbaren Fälle: So machen die positiven serologischen Befunde im Stadium I der Lyme-Borreliose 20-60 % (Berg et al., 1991), im zweiten Stadium 70-90 % und im Stadium III 90-100 % aus (Wilske et al., 1990).

Bei der Entwicklung des ELISA werden besonders Borrelienstämme genutzt, die die Antigene DbpA und OspC exprimieren. Diese sind bei der IgG- und IgM-Immunantwort die immundominantesten Epitope (Wilske et al., 2000). Im Gegensatz dazu werden beim Westernblot Ganzzell-Lysate oder rekombinante Antigene eingesetzt. Momentan werden in den klinisch etablierten Immunoblots die folgenden Antigene untersucht: VlsE (Variable major protein (VMP) like sequence Expressed), p83/100 (Protein der Membranvesikel), p58, p41, p43, p39/BmpA (Borrelia membrane protein), p30, OspC (Outer surface protein), p21, Osp17/DbpA und p14. Schulte-Spechtel und Goettner wiesen in ihren Arbeiten 2003 und 2005 nach, dass die Antigene VlsE und DbpA eine besondere Signifikanz beim Antikörpernachweis besitzen (Schulte-Spechtel, 2005; Goettner, 2005).

Theoretisch kann man, basierend auf dem Ergebnis der Tests, zwischen einer Frühinfektion und einer Seronarbe unterscheiden (Hofmann, 1992). Ein positives Ergebnis auf IgM-Antikörper ohne eine zusätzliche IgG-Erhöhung kann für eine frische Primärinfektion sprechen, wobei eine IgM-Erhöhung in späteren Stadien eher eine Reaktivierung einer latenten Infektion beschreibt. Das Vorhandensein spezifischer IgG-Antikörper basiert fast immer auf einer Immunantwort. Dabei steigt die Produktion mit der Dauer der Infektion an und ist selbst nach Therapie und längerer Zeit in kleiner Konzentration nachweisbar, dieses wird als Seronarbe beschrieben.

In Europa besteht eine große Heterogenität bei den Borrelienspezies und ihren Oberflächenantigenen, was ein Problem für den Antikörpernachweis darstellt. Insbesondere für DbpA und OspC liegen nur jeweils 40-44 % und 54-68 % identische Aminosäuresequenzen vor (Wilske, 2005).

1.7 Therapie

Die Wahl der Therapie bei bestätigter Lyme-Borreliose hängt von der klinischen Manifestationsform, dem Stadium der Infektion und dem Alter des Patienten ab. Dabei

Einleitung

bilden die 2009 geschriebenen Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) die Basis der Therapiewahl in Deutschland. Bisher existiert kein internationaler Konsens bezüglich der Therapiewahl und -dauer, sodass weiterhin regionale Unterschiede in anderen Ländern bestehen.

Im Frühstadium der Infektion wird erwachsenen Personen als Therapie der Wahl Doxycyclin 2 x 100 mg oder 1 x 200 mg p.o. über einen Zeitraum von 10-14 Tagen verabreicht. Als Alternativpräparate stehen Amoxicillin in Dosis von 3 x 500-1000 mg für 14 Tage, Cefuroximaxetil 2 x 500 mg für 14 Tage und Azithromycin 2 x 250 mg für 5-10 Tage zur Wahl (Hofmann, 2016).

Bei Spätmanifestationen ohne neurologische Symptome wird hauptsächlich Doxycyclin 2 x 100 mg, 1 x 200 mg oder Amoxicillin 3 x 500-1000 mg für jeweils 30 Tage eingesetzt (Hofmann, 2016). Liegen solche vor, greift man zu Penicillin G 4 x 5 MIO IE i.v. für 14-21 Tage, Ceftriaxon 1 x 2 g i.v. für 14-21 Tage oder Cefotaxim 3 x 2 g für 14-21 Tage (Hofmann, 2016). Der Einsatz dieser Antibiotika empfiehlt sich jedoch nicht für einen längeren Zeitraum als vorgegeben, da in solchen Fällen kein höherer Therapieerfolg vorliegt, sondern nur ein Anstieg der Nebenwirkungen.

Es ist möglich, dass sich die Symptome der Infektion in den ersten 24 Stunden nach Therapiebeginn verstärken oder weitere Allgemeinsymptome, wie z. B. Fieber, hinzukommen. Grund dafür ist die Jarisch-Herxheimer-Reaktion, die wegen des raschen Zerfalls der Borrelien und Ausschüttung ihres Zellinhalts hervorgerufen wird. Die Labordiagnostik stellt dabei kein Kriterium für den Therapieerfolg dar, dieser wird anhand des klinischen Bildes und Befindens des Patienten beurteilt. Bis heute sind noch keine Erregerresistenzen gegenüber den Antibiotika entdeckt worden, was für die guten Therapieergebnisse spricht.

Der Erfolg der antibiotischen Therapie ist insgesamt sehr gut, insbesondere in der Frühphase, sodass es selten zu Rückfällen kommt (Gerber et al., 1996; Nau et al., 2009). Eine erstmalige Infektion stellt keinen Schutz vor einer Reinfektion dar, da kein immunologisches Gedächtnis gebildet wird, sodass bei erneutem Stich und klinischer Symptomatik von einer erneuten Infektion ausgegangen werden kann. Ein fehlender Therapieerfolg liegt in den meisten Fällen bei fehlender Compliance des Patienten oder fehlerhafter Einnahme der Antibiotika vor.

1.7.1 Therapieempfehlungen bei Lyme-Borreliose

	Antibiotikum	Erwachsene Dosis/Tag	Kinder Dosis/kg KG/Tag	Dauer
Lokalisierte Frühmanifestationen: solitäres Erythema migrans, Erythema chronicum migrans	Doxycyclin	2 x 100 mg oder 1 x 200 mg p.o.	Ab 9. Lj. 4 mg (maximal 200 mg)	10-14 Tage
	Amoxicillin	3 x 500-1000 mg p.o.	50 mg p.o.	14 Tage
	Cefuroximaxetil	2 x 500 mg p.o.	30 mg p.o.	14 Tage
	Azithromycin	2 x 250 mg p.o.	5-10 mg p.o.	5-10 Tage
Disseminierte Frühmanifestationen: multiple Erythemata migrantia, Erythema migrans mit grippeartigen Allgemeinsymptomen, Borrelien-Lymphozytom (solitär und disseminiert)	Doxycyclin	2 x 100 mg oder 1 x 200 mg p.o.	Ab 9. Lj. 4 mg (maximal 200 mg)	14-21 Tage
	Amoxicillin	3 x 500-1000 mg p.o.	50 mg p.o.	14-21 Tage
	Cefuroximaxetil	2 x 500 mg p.o.	30 mg p.o.	14-21 Tage
	Azithromycin	2 x 250 mg p.o.	5-10 mg p.o.	5-10 Tage
Spätmanifestationen: Acrodermatitis chronica atrophicans (ödematös-infiltratives und atrophes Stadium) mit neurologischer Symptomatik	Penicillin G	4 x 5 Mio. IE i.v.	200-500 000 IE i.v.	14-21 Tage
	Ceftriaxon	1 x 2 g i.v.	50 mg i.v.	14-21 Tage
	Cefotaxim	3 x 2 g i.v.	100 mg i.v.	14-21 Tage

Einleitung

Spätmanifestationen: Acrodermatitis chronica atrophicans (ödematös- infiltratives und atrophes Stadium) ohne neurologische Symptome	Doxycyclin	2 x 100 mg 1 x 200 mg p.o.	Ab 9. Lj. 4 mg (maximal 200 mg)	30 Tage
	Amoxicillin	3 x 500- 1000 mg p.o.	50 mg	30 Tage

Tabelle 1.7.1-1: nach Hofmann (2016). „Kutane Lyme Borreliose“. AWMF-Register Nr. 013/044 Klasse: S2k

2 Zielsetzung

Diese Arbeit hat folgende Ziele:

1. Entwicklung einer neuen diagnostischen Methode zur Detektion von Borellienantikörpern:

Der SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM soll die Nachteile der bisherigen Diagnosemethoden bei der Analyse der Borrelienantikörpern beheben. Unter anderem ist mit den etablierten Tests eine Quantifizierung der Antikörpertiter nicht möglich. Mittels des Immunoblots lassen sich nur qualitative Resultate im Rahmen eines positiven, grenzwertigen oder negativen Ergebnisses erreichen. Aufgrund dessen ist eine exakte Verlaufskontrolle der Antikörpertiter hiermit nicht durchführbar. Der SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM ist ein quantitativer Fluoreszenzimmunoassay, womit exakte mengenmäßige Antikörpertiter aufgezeichnet werden können. Somit kann auch eine Verlaufskontrolle mittels der Antikörperwerte registriert werden. Diese Arbeit dient zur Bewertung und Weiterentwicklung dieser neuen diagnostischen Methode.

2. Durchführbarkeit des SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM:

Als neue in-vitro-diagnostische Methode zum Nachweis von humanen Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi mithilfe der FACS-Technologie sollte die Umsetzung dieses Tests in Laborbedingungen beurteilt werden.

3. Präzision des SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM:

Die Testergebnisse der durchflusszytometrischen Methode sollten mit denen vom klinisch etablierten Immunoblot-Verfahren auf ihre Übereinstimmung untersucht werden.

4. Evaluierung des SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM:

Der SERION Multianalyt™ Borrelia burgdorferi IgG und IgM sollte auf seine Tauglichkeit als Mittel zur serologischen Untersuchung für den klinischen Alltag

Zielsetzung

geprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 LineBlot-Verfahren

Der *Borrelia* Virastripe® LineBlot wird von der Firma Viramed® Biotech AG hergestellt und als etabliertes serologisches Testverfahren zum quantitativen Nachweis von Borrelienantikörpern eingesetzt. Die Auswertung dieses Tests entspricht den Kriterien der Mikrobiologisch-Infektiologischen Qualitätsstandards 12, hierbei wird der LineBlot nach den Richtlinien 98/79/EG hergestellt und erfüllt die Voraussetzungen der DIN 58967-40 und DIN 58969-44 (Wilske et al., 2000).

Der Stripe-Immunoblot besteht aus einem Nitrozellulosestreifen, der in zwei Abschnitte geteilt ist: der obere Kontrollabschnitt, der aus der Negativkontrollbande, der Serumkontrolle, drei Konjugatkontrollen (IgG, IgA und IgM) und der Cut-off-Kontrolle besteht. Der untere Teil (unterhalb der grünen Trennlinie) umfasst den Analysebereich, welcher die Borrelienantigene trägt.

Der Großteil der verwendeten Antigene kommt von den Spezies *Borrelia burgdorferi afzelii* (Pko) und *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, und für VlsE wird ein rekombinantes Antigen eingesetzt.

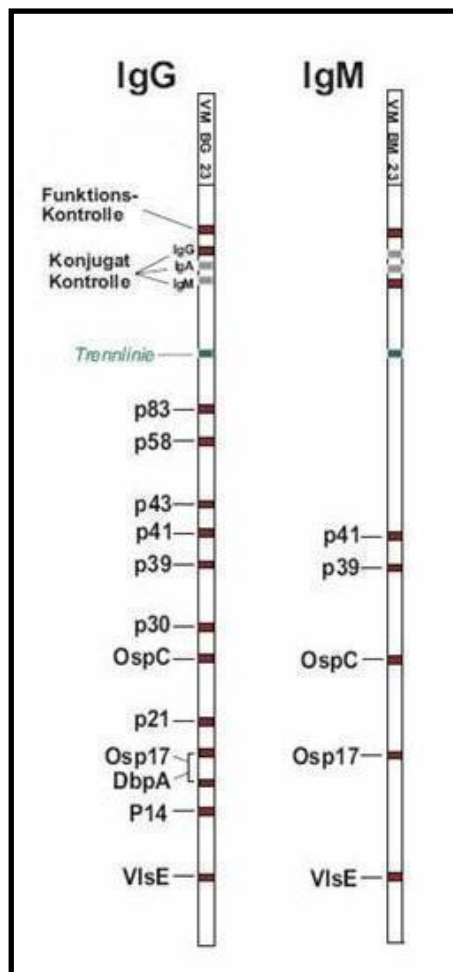


Abbildung 3.1-1: Borrelia Virastripe® LineBlot IgG und IgM

Die IgM-Stripe-Immunoblots können bis zu fünf der folgenden Antigene nachweisen:

- VisE** Variable major protein (VMP) like sequence Expressed
Antikörper gegen VisE werden als spezifisch bezeichnet und können auch im Spätstadium gefunden werden (Schulte-Spechtel et al., 2003).
- p41** Flagellin-Protein
Dieses Antigen wird als bedingt spezifisches Antigen eingeordnet, da schon Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten und weiteren geißeltragenden Bakterien beschrieben wurden (Alfen et al., 1994; Wilske et al., 1990).

Material und Methoden

p39 Borrelia membrane protein A (BmpA)
Antikörper gegen p39 sind hochspezifisch und werden somit oft in frühen Stadien der Infektion nachgewiesen (Aguero-Rosenfeld et al., 1993).

OspC Outer surface protein C
Hochspezifisches Antigen, von dem mindestens 13 verschiedene Immuntypen existieren und welches oft als erstes Borrelienantigen in Nachweisverfahren erscheint (Aguero-Rosenfeld et al., 1993; Fingerle et al., 1995; Wilske et al., 1990).

Osp17 Outer surface protein 17
Mit Hilfe dieses Spezies-spezifischen Antigens binden Borrelien an ihre Wirtszellen (Schulte-Spechtel et al., 2003; Heikkilä et al. 2002).

Beim Borrelia ViraStripe® IgG werden insgesamt elf Antigene detektiert.

VlsE Variable major protein (VMP) like sequence Expressed
Antikörper gegen VlsE werden als spezifisch bezeichnet und können auch im Spätstadium gefunden werden (Schulte-Spechtel et al., 2003).

p83/100 Protein der Membranvesikel auf der Oberfläche
Die Antikörper gegen dieses Antigen sind hochspezifisch und fallen 6-12 Wochen nach der Infektion auf und können in allen Stadien nachgewiesen werden (Aguero-Rosenfeld et al., 1993; Ditton et al., 1992; Ma et al., 1992).

p58 Ein wenig charakterisiertes, jedoch spezifisches Protein, das gehäuft im Stadium III vorkommt.

p43 Ähnlich wie p58 ist dieses Protein wenig charakterisiert, aber spezifisch und eher typisch im Stadium III.

p39 Borrelia membrane protein A (BmpA)
Antikörper gegen p39 sind hochspezifisch und werden somit oft in frühen

Material und Methoden

Stadien der Infektion nachgewiesen (Aguero-Rosenfeld et al., 1993).

p30 Ein weiteres wenig untersuchtes Protein, das aber laut Hersteller spezifisch ist (Viramed®; BorreliaViraStripe TestKit IgG).

OspC Outer surface protein C
Hochspezifisches Antigen, von dem mindestens 13 verschiedene Immuntypen existieren (Aguero-Rosenfeld et al., 1993; Fingerle et al., 1995; Wilske et al., 1990).

p21 Ein wenig charakterisiertes, aber spezifisches Protein (CDC 1994).

Osp17/ Outer surface protein 17

DbpA Decorin-binding protein A
Mithilfe dieses speziesspezifischen Antigens binden Borrelien an ihre Wirtszellen an (Schulte-Spechtel et al., 2003; Heikkilä et al., 2002).

p14 Ein Protein, das als spezifisch immunogen bei *Borrelia afzelii* beschrieben wurde (Hauser et al., 1997).

Das Prinzip dieses Tests liegt in der Antigen-Antikörper-Reaktion. Auf dem Nitrozellulosestreifen liegen in bestimmten Abständen fixierte Antigene von Borrelienspezies. Die Borrelia-spezifischen IgG- oder IgM-Antikörper aus dem Patientenserum oder -liquor binden während der Inkubation an ihre entsprechenden Antigene. Im nächsten Schritt (Konjugatreaktion) bindet das AP-Konjugat an den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex, wobei das Chromogen/Substrat von der alkalischen Phosphatase umgesetzt wird und sich lila färbt. Durch die zuvor durchgeführten Waschschriffe (nach der Seruminkubation, der Konjugatinkubation und der Chromogen/Substrat-Inkubation) werden ungebundene Antikörper und Reagenzien entfernt und somit nur Antigen-Antikörper-Reaktionen gefärbt.

Die quantitativen Ergebnisse der Lineblots können auch mit densitometrischen Verfahren ausgewertet werden. Diese Methode verspricht eine verbesserte Objektivierbarkeit und Reproduzierbarkeit.

3.1.1 Auswertung der LineBlots

Um einen Teststreifen als gültig gelten zu lassen, müssen (laut Hersteller) die Serumkontrolle, die Konjugatkontrolle (wobei die stärkste von den drei Banden zur untersuchten Konjugatklasse gehören muss) und die Cut-off-Kontrolle mit einem Streifen sichtbar und darf die Negativkontrollbande nicht gefärbt sein. Falls auch nur eine dieser Voraussetzungen nicht zutrifft, wird der Streifen als ungültig charakterisiert und nicht ausgewertet.

Eine Bande wird dann als deutlich gewertet, wenn sie gleich oder stärker intensiv als die Cut-off-Kontrolle gefärbt ist. Eine nicht vorhandene oder kleinere Bandenintensität (verglichen mit dieser der Cut-off-Kontrolle) wird nicht gewertet. Die Auswertung des kompletten Streifens wird anhand der Banden gemacht.

Für den **IgM**-Test sind die Interpretationskriterien wie folgt:

Positiv	mindestens eine deutliche Bande (\geq Cut-off) von p39, OspC, Osp17, VlsE oder p41 stärker als die Cut-off -Kontrolle
Negativ	keine deutliche Bande oder p41 gleich der Cut-off -Kontrolle

Im Gegensatz hierzu gibt es bei dem IgG-Test drei mögliche Ergebnisse:

Positiv	mindestens zwei deutliche Banden aus p83, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, Osp17 oder DbpA, p14, VlsE
Grenzwertig	eine deutliche VlsE -Bande
Negativ	nur eine deutliche (außer VlsE) oder keine sichtbare Bande

3.2 SERION Multianalyt™ *Borrelia burgdorferi* IgG und IgM

3.2.1 Partikelbasierter Fluoreszenzimmunoassay zum Nachweis von humanen Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*

SERION Multianalyt™ *Borrelia burgdorferi* IgG und IgM ist eine quantitative Nachweismethode von humanen IgG- und IgM-Antikörpern im Serum, Plasma und Liquor gegen eine Bandbreite von Antigenen der Spirochäten *Borrelia burgdorferi*.

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Hierbei werden als Festphase für die adsorptive Kopplung der Sondenmoleküle Polystyrolpartikel (BEAD) in einer Größenordnung von 3 µm bis 8 µm eingesetzt. Durch die Färbung dieser mit unterschiedlichen Intensitäten eines roten Fluorophors wird eine Auswahl von bis zu zehn verschieden gefärbten Partikel-Sets erreicht. Dank der Oberflächenmodifizierung werden über kovalente Kräfte Antigene (Sondenmoleküle) an die Partikel gebunden. Das Gemisch aller dieser beschichteten Partikel-Sets bildet den SERION Multianalyt™ Plex. Im *Borrelia burgdorferi* IgG- und IgM-Plex werden acht verschiedene Antigene der humanpathogenen Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* eingesetzt.

Im Folgenden sind diese genauer aufgezählt:

- **VlsE garinii PBi**
- **p100 garinii Pbi**
- **OspC afzelii Pko**
- **DbpA garinii Pbr**
- **DbpA afzelii PKo**
- **p58 garinii Pbi**
- **p41i burgdorferi sensu stricto GeHO**

- **Lysat afzelii Pko**

Bei der ersten Inkubation binden die humanen IgG- oder IgM-Antikörper, im Folgenden als Analyte bezeichnet, an die ihnen entsprechenden Antigene auf den Partikeln. Während der nächsten Inkubation reagieren Antikörper (Detektormoleküle), welche mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, mit den gebundenen Analyten und haften an ihnen. Somit verhält sich die Menge der gebundenen Detektormoleküle proportional zur Analytkonzentration. Der markierte Partikel-Komplex wird vom Durchflusszytometer gemessen und nach Größe und Fluoreszenz klassifiziert. Mit der easy-PLEX-Software wird die Fluoreszenz jedes Partikels zu den passenden Analytbestimmungen zugeordnet. Die Konzentration der gesuchten IgG- und IgM-Antikörper gegen die acht genannten *Borrelia*- Antigene wird somit indirekt über die mittlere Detektormolekül-Fluoreszenz je Partikel-Set gemessen.

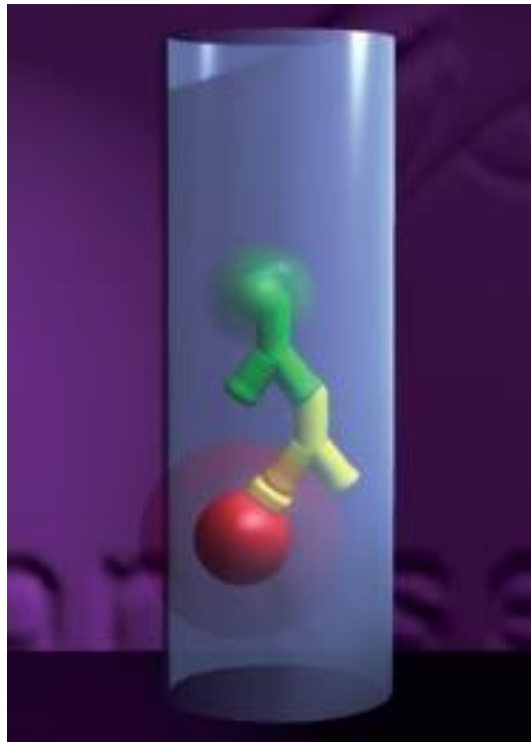


Abbildung 3.2.1-1: Methodisches Prinzip des SERION Multianalyt™ Immunoassays zur Detektion von Borrelienantikörpern. Abbildung von:
<http://www.virion-serion.de/typo3temp/pics/4994dfec49.png>

In der Abb. 3.2.1-1 wird die beschriebene Reaktion beispielhaft dargestellt. Der beschichtete Partikel (rot), welcher ein Antigen (gelb) trägt, ist mit dem humanen IgG- oder IgM-Antikörper (gelb) gekoppelt. An diesem haftet das markierte Detektormolekül

(grün), dessen Fluoreszenz vom Durchflusszytometer gemessen wird.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS-Zytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, ist ein optisches Messverfahren für Partikel (Zellen, Polystyrolpartikel, Antikörper etc.), bei dem diese gezählt und nach verschiedenen Eigenschaften analysiert werden.

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse werden Zellen in Flüssigkeitssuspension wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeleitet. Dieses Licht wird abhängig von der Zellgröße nach vorne (Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter) und zudem je nach Granularität des Zellinhalts seitlich (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter) gestreut und von Photodetektoren registriert. Darüber hinaus wird auch die Intensität der Fluoreszenz des zu untersuchenden Partikels gemessen. Als Farbstoffe werden hier in den meisten Fällen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) oder Propidiumiodid eingesetzt. Die Fluoreszenz ergibt sich daraus, dass Fluorochrome Lichtenergie bestimmter Wellenlänge absorbieren, sodass die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Sobald diese den Laser passieren und in ihr Grundenergieniveau zurückfallen, geben sie Energie (in Form von Photonen) ab. Photodetektoren messen die Konzentration der Photonen, welche sich proportional zur Menge von z. B. gebundenen Antikörpern oder Zellen verhält und damit ein quantitatives Ergebnis gibt. Mithilfe dieser Methode erhält man also nicht nur Informationen zur Größe und Granularität der Zelle, sondern auch zu ihren Eigenschaften.

Der Unterschied zwischen einem Durchflusszytometer und einem FACS-Gerät liegt darin, dass das FACS zusätzlich zur Messung die Zellen entsprechend ihrer Signale sortiert. Den Fluoreszenzdetektoren sind Vibratoren und Elektromagnete nachgeschaltet, die die Zellen in entsprechende Gefäße sortieren.

Bei dem untersuchten Assay wurde nur der 488 nm-Argon-Ionen Laser im FACSCalibur der Firma BD eingesetzt.

3.3 Chemikalien, Lösungen, Geräte

3.3.1 Probengewinnung

Die Blutproben wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein (Technische Universität München) mit den üblichen sterilen Methoden entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert und die Seren bei -8 °C gelagert.

3.3.2 Verwendete Chemikalien

- beschichtete Polystyrolpartikel (BEAD) mit Durchmesser von 3 µm bis 8 µm in lyophilisierter Form
- Kontrollprobe CO1, Standardkontrolle: Humanserum in Phosphatpuffer mit Protein. Negativ getestet für Anti-HIV-Antikörper, Hepatitis-B-Virus-surface-Antigen und Anti-HCV-Antikörper (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid, Farbstoff: Amaranth O)
- Kontrollprobe CO2, Negativkontrolle: Humanserum in Phosphatpuffer mit Protein. Negativ getestet für Anti-HIV-Antikörper, Hepatitis-B-Virus-surface-Antigen und Anti-HCV-Antikörper (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid, Farbstoff: Lissamin-Grün V)
- Konjugat, analytische Detektorantikörper konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoffen: gegen humanes IgG, IgA oder IgM gerichteter, polyklonaler Antikörper (aus Ziege, Schaf oder Esel) oder analytischer Antikörper konjugiert mit z. B. Phycoerythrin oder Fluoreszin, stabilisiert in Protein-Stabilisatorlösung (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid)
- Waschlösungskonzentrat für die BioTek-Vakuum-Filtrationseinheit, bestehend aus Tris-gepufferter Natriumchloridlösung und Tween/Polysorbat 20 (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid)
- Verdünnungspuffer: Phosphatpuffer mit Protein und Tween/Polysorbat 20 (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid, Farbstoff: Bromphenolblau)

Material und Methoden

Natriumsalz)

- Testpuffer TSOL: Protein-Stabilisatorlösung (Konservierungsmittel 0,01 % Methylisothiazolon; 0,01 % Bromnitrodioxan)
- Messpuffer MSOL: Phosphatpuffer mit Protein und Tween/Polysorbat 20 (Konservierungsmittel < 0,1 % Natriumazid)
- SERION Rf-Absorbens
- SERION Multianalyt™ Setup
- SERION Multianalyt™ FlowControl
- FACS Flow *BD, Heidelberg*
- Aqua dest.

3.3.3 Verwendete Geräte

- Vortex
- Zentrifuge Eppendorf 5415 C *Eppendorf AG, Hamburg*
- Temperierbarer Schüttler für Mikrotiterplatten *biosan Medical-Biological Research & Technologies*
biosan pst-60hl-4
Riga, Lettland
- Vakuum-Filtrationseinheit BioTek Elx50 *BioTek, Winooski, USA*
- Durchflusszytometer BD FACSCalibur *BD, Heidelberg*
- Software Cellquest pro *BD, Heidelberg*
- SERION Multianalyt™ easyPLEX Auswertungssoftware *Virion\Serion GmbH, Würzburg*

- GraphPad Prism 6

3.3.4 Verwendete Materialien

- Filtrationsplatte mit 96 Kavitäten in 8 x 12 Ausrichtung
- viramed IgG- und IgM-Immunooblots, hergestellt von Ulrike Rothenhäusler, MTA an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

3.4 Methoden

Die Verdünnung der Seren und die Präparation der Messplatte fanden im Borreliose-Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein und die Messung mit dem FACSCalibur im Zentrum für Allergie und Umwelt München (ZAUM) statt.

3.4.1 Probenverdünnung

Für die Vorbereitung der Proben wurden im ersten Schritt die tiefgefrorenen Seren bei Raumtemperatur in ihren flüssigen Zustand gebracht. Jede Probe wurde jeweils zweimal verdünnt, da die IgG- und IgM-Analysen unabhängig voneinander stattgefunden haben. Alle Schritte wurden laut den Gebrauchsanweisungen und Laborhinweisen des Herstellers befolgt.

Die IgG-Serumverdünnung fand in einem Verhältnis 1 : 200 statt, sodass 5 µl Probe in 1000 µl SERION-Verdünnungspuffer gelöst wurden. Bei der Vorbereitung der IgM-Reihe wurde ein Verhältnis von 1 : 100 eingehalten. Dabei mussten 800 µl SERION-Verdünnungspuffer mit 200 µl SERION-Rf-Absorbens präpariert werden.

Bei den Proben für den IgM-Nachweis besteht die Gefahr von falsch-positiven Ergebnissen, hervorgerufen durch IgM-Rheumafaktor-Antikörper, welche an IgG-Immunkomplexe binden. Zusätzlich können bei Proben mit hohem, erregerspezifischem IgG-Anteil bindungsschwächere IgM-Antikörper durch bindungsstärkere IgG-Antikörper verdrängt werden und dadurch ein falsch-negatives Ergebnis bewirken. Zur Verhinderung dieser Effekte sollten die Proben bei der Serumprobenverdünnung für die

IgM-Messung mit Rf-Absorbens vorbehandelt werden.

Als nächster Schritt erfolgte die Beimengung der 10 µl Serum in ein Eppendorfgefäß. Zur Absorption des Rf-Absorbens wurden die Proben mind. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Zentrifugation der IgM-Verdünnungen bei 4000 U/min für 5 min und die Übertragung der flüssigen Phase in neue Küvetten.

3.4.2 Präparation der Messplatte

Als erster Schritt hierbei stand die Rekonstitution der Partikellyophilisate (**BEAD**) mit 3 ml **TSOL** pro Partikelfläschchen an, wobei die Lösungen nur durch vorsichtiges Schütteln homogenisiert werden durften, um eine Schaumbildung zu verhindern.

Zur Vorbenetzung der Filtrationsplatte wurde diese in der BioTek-Vakuum-Filtrationseinheit mit 250 µl **Waschpuffer** aufgefüllt und abgesaugt. Danach musste die Unterseite der Platte sorgfältig von jeglichen Flüssigkeitsresten gesäubert werden, um Verluste des Kavitäteninhalts durch Diffusionskräfte zu verhindern. Bei jeder Messreihe, wobei IgG- und IgM-Proben getrennt gemessen wurden, wurden die ersten vier Kavitäten (pro Messreihe) als Kontrollen genutzt. Im Folgenden ist zu vermerken, dass die gebrauchsfertigen Kontrollen, die rekonstituierten Partikellösungen und das Konjugat in zwei verschiedenen Zusammensetzungen vorlagen, jeweils für die IgG- und IgM-Messreihe.

Kavität A1 war der Reagenzleerwert (RGL), der in diesem Schritt nicht befüllt wurde, B1 und C1 wurden mit 20 µl **CO1** und D1 mit 20 µl **CO2** gefüllt. **CO1** ist die Standardkontrolle des Tests und **CO2** die Negativkontrolle. In jede weitere Kavität wurden 20 µl der **verdünnten Patientenproben** pipettiert. Danach wurden 100 µl der **rekonstituierten Partikellösung** mit einer Pipette in jede Kavität zugesetzt. Nach Abdeckung der Filtrationsplatte erfolgte die Inkubation im temperierbaren Schüttler für 30 min bei 37 °C (Einstellung des Gerätes: 36,1 °C). Anschließend wurde die Platte in der BioTek-Vakuum-Filtrationseinheit gewaschen. Dabei wurde zuerst der Inhalt der Kavitäten abgesaugt, diese viermal mit 250 µl **Waschpuffer** aufgefüllt und abgesaugt (ca. - 300 mbar für 10 sec pro Zyklus). Wiederum mussten jegliche Flüssigkeitsreste von der Unterseite entfernt werden.

Als nächster Schritt stand die Konjugatzugabe an, bei dem 50 µl des spezifischen **Konjugats** in alle Kavitäten gefüllt wurden. Die abgedeckte Platte wurde nun zum

Material und Methoden

zweiten Mal bei 37 °C für 30 min im temperierbaren Schüttler inkubiert. Danach wurde die Filtrationsplatte wieder in der BioTek-Vakuum-Filtrationseinheit viermal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen, dieser abgesaugt und getrocknet. Die Präparation der Messplatte wurde mit der Resuspendierung der Partikel mit **SERION MSOL** abgeschlossen. Dabei wurden in alle Kavitäten jeweils 100 µl **SERION MSOL** pipettiert und die Messplatte für 5 min bei 800 rpm und Raumtemperatur auf dem biosan-Thermoschüttler geschüttelt.

Das folgende Schema stellt die Aufstellung der 8 x 12-Messplatte für einen Versuchsdurchlauf (IgG oder IgM) dar, wobei P01-P92 die Kavitäten für die Patientenproben darstellen.

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B	RGL	P05	P13	P21	P29	P37	P45	P53	P61	P69	P77	P85
C	CO1	P06	P14	P22	P30	P38	P46	P54	P62	P70	P78	P86
D	CO1	P07	P15	P23	P31	P39	P47	P55	P63	P71	P79	P87
E	CO2	P08	P16	P24	P32	P40	P48	P56	P64	P72	P80	P88
F	P01	P09	P17	P25	P33	P41	P49	P57	P65	P73	P81	P89
G	P02	P10	P18	P26	P34	P42	P50	P58	P66	P74	P82	P90
H	P03	P11	P19	P27	P35	P43	P51	P59	P67	P75	P83	P91
I	P04	P12	P20	P28	P36	P44	P52	P60	P68	P76	P84	P92

Abbildung 3.4.2-1: Schematische Darstellung einer Multianalyt-Filtrationsplatte

3.4.3 Messung im Durchflusszytometer

Aufgrund der Tatsache, dass das FACSCalibur nicht direkt aus der Filtrationsplatte messen kann, mussten die Proben erst in Messröhrchen überführt werden. Hierbei wurden den Kavitäten 200 µl **SERION MSOL** zugesetzt und die Lösungen mithilfe einer Pipette in Messröhrchen gefüllt.

Die Software Cellquest pro wurde bei mittlerer Geschwindigkeit des FACSCalibur so eingestellt, dass sie nach 500.000 Ereignissen oder 30 sec die Messung unterbrechen sollte.

Folgendes Schema beschreibt den Testverlauf, wie aus der SERION-Multianalyt-Gebrauchsanweisung entnommen.

SERION Multianalyt™ *Borrelia burgdorferi* IgG

Rekonstitution der Partikel

(pro Fläschchen mit 3 ml Testpuffer TSOL)



Probenverdünnung

(Patientenproben)

1+200



Filtrationsplatte mit Waschlösung füllen (250 µl) und absaugen
(Schritt entfällt bei Verwendung von V-Boden Mikrotiterplatten)



Zugabe der verdünnten Proben und der
gebrauchsfertigen Kontrollproben (20 µl)



Zugabe der rekonstituierten Partikel (100 µl)



INKUBATION 30 Min./37°C/800 rpm



WASCHEN



Zugabe der Konjugatlösung (50 µl)



INKUBATION 30 Min./37°C/800 rpm



WASCHEN



Zugabe des Messpuffers MSOL (ca. 200 µl; Volumen variiert in
Abhängigkeit des verwendeten Geräts)



Schütteln zum Resuspendieren der Partikel 5 Min./37°C/800 rpm



Fluoreszenzmessung am Durchflusszytometer

Partikel bei ca. 700 nm

Konjugat bei ca. 585 nm

SERION Multianalyt™ *Borrelia burgdorferi* IgM

Rekonstitution der Partikel

(pro Fläschchen mit 3 ml Testpuffer TSOL)



Probenverdünnung mit Rf-Absorption

(Patientenproben)

1+100



Filtrationsplatte mit Waschlösung füllen (250 µl) und absaugen
(Schritt entfällt bei Verwendung von V-Boden Mikrotiterplatten)



Zugabe der verdünnten Proben und der
gebrauchsfertigen Kontrollproben (20 µl)



Zugabe der rekonstituierten Partikel (100 µl)



INKUBATION 30 Min./37°C/800 rpm



WASCHEN



Zugabe der Konjugatlösung (50 µl)



INKUBATION 30 Min./37°C/800 rpm



WASCHEN



Zugabe des Messpuffers MSOL (ca. 200 µl; Volumen variiert in
Abhängigkeit des verwendeten Geräts)



Schütteln zum Resuspendieren der Partikel 5 Min./37°C/800 rpm



Fluoreszenzmessung am Durchflusszytometer

Partikel bei ca. 700 nm

Konjugat bei ca. 585 nm

3.4.4 Auswertung der Messdaten

Die quantitativen Messdaten der Cellquest pro Software wurden von der SERION-Multianalyt-easyPLEX-Software ausgewertet. Das Programm wurde mithilfe eines MARX-Crypto-Box-Kopierschutzsteckers freigeschaltet. Im Programm musste eine virtuelle Filtrationsplatte ausgelegt werden, wobei für die IgG-Messungen, je nach eingesetztem Testkit, die vorgefertigten Chargen MCD.AG oder MDC.AA und entsprechend für die IgM-Reihe die Chargen MBD.AN oder MFC.AE gewählt wurden. Nach Übertragung der Daten vom FACSCalibur wurden diese von der Software automatisch analysiert und ausgewertet.

Bei der Analyse wird die Konzentration der Analyte mithilfe des „4-Parameter logistic-log-Modell (4PL)“ bestimmt. Die folgende Formel bezeichnet die mathematische Funktion:

$$MFI = A + \frac{D - A}{1 + e^{B(C - \ln \text{Konz.})}}$$

MFI = Median der gemessenen Fluoreszenzintensitäten

Die Parameter A, B, C und D geben den Kurvenverlauf exakt wieder und definieren:

Parameter A = untere Asymptote

Parameter B = Steigung der Kurve

Parameter C = Wendepunkt der Kurve

Parameter D = obere Asymptote

Zur Bestimmung der Analytkonzentrationen benutzt die Auswertungssoftware die folgende Formel:

$$\text{Konzentration} = \exp\left\{\frac{C}{\ln\left[\frac{D-A}{(MFI-RBLK) \cdot STD_{\text{soll}} / (STD_{\text{Dist}} - RBLK) - 1}\right]} / B\right\}$$

RBLK = Reagenzleerwert

STD_{soll} = Sollwert des Standards

STD_{Dist} = aktueller Tageswert des Standards

*Standard = Kontrollproben CO1, CO2

3.4.5 Auswertung der Antikörpertiter

Für alle acht Antigene gelten dieselben Auswertungskriterien hinsichtlich der Antikörperkonzentration.

Positiver Antikörpertiter	> 15 U/ml
Grenzwertiger Antikörpertiter	10-15 U/ml
Negativer Antikörpertiter	< 10 U/ml

Dabei werden jedoch den verschiedenen Antikörpertitern unterschiedliche Wertigkeiten zugeordnet.

Für *Borrelia burgdorferi* IgG sind sie wie folgt:

- **VlsE** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **p100** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **OspC** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **DbpA Pbr** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 3 Punkte
- **DboA Pko** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 3 Punkte

Material und Methoden

- **p58** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **p41i** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **Lysat** 10-15 U/ml = 1 Punkt > 15 U/ml = 2 Punkte

Für *Borrelia burgdorferi* IgM:

- **VlsE** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **p100** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **OspC** 10-15 U/ml = 4 Punkte > 15 U/ml = 8 Punkte
- **DbpA Pbr** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 3 Punkte
- **DboA Pko** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 3 Punkte
- **p58** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **p41i** 10-15 U/ml = 2 Punkte > 15 U/ml = 4 Punkte
- **Lysat** 10-15 U/ml = 1 Punkt > 15 U/ml = 2 Punkte

Für jede Probe werden die Punkte der Titer addiert, um eine Gesamtpunktzahl zu ergeben. Ein negatives Ergebnis für die IgG- oder IgM-Messung liegt vor, wenn die Gesamtpunktzahl kleiner drei (3) ist, ein grenzwertiges bei drei bis sechs (3-6) und ein positives, wenn die addierten Punkte größer sechs (6) sind.

negative Probe	< 3 Punkte
grenzwertige Probe	3-6 Punkte
positive Probe	> 6 Punkte

3.4.6 Testgültigkeitskriterien

Damit eine Messung als valide gewertet wird, müssen verschiedene Testkriterien gelten. Erstens müssen die Mittelwerte der Konzentrationen mit dem Ziel-Konzentrationswert (angegeben auf dem chargenspezifischen Zertifikat) übereinstimmen. Darüber hinaus muss der Reagenzleerwert (RGL) unter dem Median der Fluoreszenzintensität (MFI) liegen sowie die Negativkontrolle in der Auswertung als negativ gemessen werden. Die MFI-Werte des Standards (CO1) müssen (nach Abzug des Reagenzleerwertes) für jeden Analyten innerhalb der Gültigkeitsbereiche liegen, welche auf dem chargenspezifischen Qualitätskontroll-Zertifikat angegeben sind. Zu guter Letzt dürfen die MFI-Werte der beiden Standards (CO1) nicht mehr als 20 % differieren.

Wenn diese Kriterien nicht erfüllt sind, gilt die gesamte Messung mit allen Kavitäten als ungültig und wird als solche markiert.

Auch einzelne Proben gelten als ungültig, wenn einer oder beide der folgenden Fälle vorliegt.

- Wenn weniger als 100 Ereignisse bei einer Probe vorliegen.
- Sobald die MFI-Werte der Kontrollpartikel für unspezifische Bindungen über einem vorgegebenen Wert liegen, welcher in der Chargenspezifikation der Software-Datenbank zu finden ist.

Einzelne ungültige Proben erhalten keine Werte und werden mit einem roten Ausrufezeichen

(!) gekennzeichnet.

3.5 Vergleich der Messwerte mit etablierten Methoden

Die erhaltenen Werte wurden mit den serumgleichen *Borrelia-ViraStripe-IgG*- und *IgM*-Immunoblots, als etablierte Standardmethode an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, verglichen.

Beide Tests unterscheiden sich in manchen Punkten. Die *IgG*-Stripe-Immunoblots tragen Testfelder für elf (11) und die *IgM*-Streifen für fünf (5) verschiedene Antigene von den Genospezies *Borrelia burgdorferi afzelii* (Pko) und *Borrelia burgdorferi sensu strictu*. Im Gegensatz dazu werden bei dem partikelbasierten Fluoreszenzimmunoassay für *IgG*

Material und Methoden

und IgM acht (8) Antigene von *Borrelia burgdorferi sensu strictu*, *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* analysiert.

Analysierte Antigene der jeweiligen Testverfahren

Tabelle 3.5-1: Vergleich der analysierten Antigene im Immunoblot und Multianalyt IgG und IgM

SERION Multianalyt IgG und IgM	viramed ViraStripe IgG	viramed ViraStripe IgM
VisE	VisE	VisE
p100	p83/p100	
OspC	OspC	OspC
DbpA Pbr		
DbpA Pko	DbpA	
p58	p58	
p41i		p41
Lysat		
	Osp17	Osp17
	p39	p39
	p14	
	p30	
	p21	
	p43	

3.5.1 Zusammensetzung der Proben und Patienten

In dieser Arbeit wurden Seren von Patienten getestet, die wegen Ausschlusses auf Lyme-Borreliose oder für Serumkontrollen bei bestätigter Infektion in die Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München kamen.

Material und Methoden

Das Patientenkollektiv bestand aus 101 Patienten, die je nach Diagnose in sieben Gruppen eingeteilt wurden (EM; MEM; Lymphozytom; ACA; Lyme-Arthritis; Neuroborreliose; atypische, anderweitige Diagnosen). Insgesamt wurden 116 Seren getestet, wobei von manchen Patienten mehrere Seren aus verschiedenen Zeitpunkten vorlagen. Von neun Patienten waren zwei unterschiedliche Seren vorhanden, nämlich vor und nach erfolgter Therapie, drei unterschiedliche Seren gab es bei zwei Patienten und vier Seren verschiedener Zeitpunkte waren einem Patienten zugeordnet

4 Ergebnisse

4.1 Interpretation der Ergebnisse

Beide Methoden wurden hinsichtlich ihrer Gesamtergebnisse jeder Probe und der entsprechenden Antigenergebnisse verglichen. Hierbei muss betont werden, dass es bei der Interpretation der IgM-Teststreifen keine Vorgabe für grenzwertige Ergebnisse gibt, im Gegensatz dazu jedoch der IgM-Immunoassay der durchflusszytometrischen Methode ein solches vorsieht. Die Tabelle 3.5-1: Vergleich der analysierten Antigene im ImmunoBlot und Multianalyt IgG und IgM zeigt die übereinstimmenden Antigene der verglichenen Methoden an. Für die IgG-Tests wurden jeweils das komplette Ergebnis und die Antigene VIsE, p100, OspC, DbpA und p58 gegenübergestellt. Für die IgM-Tests wurden die Komplettergebnisse und die Antigene VIsE, OspC, Osp17 und p39 beurteilt. Hierbei wurden beim SERION Multianalyt als Ergebnisse nicht die Werte der Antikörpertiter, sondern deren Gesamtinterpretation herangezogen.

4.2 Kohorte

In der Arbeit wurden Blutproben von Patienten benutzt, die in den Jahren 2010 bis 2013 zur serologischen Kontrolle in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München entnommen wurden. Die Patientenkohorte bestand aus 60 weiblichen und 41 männlichen Patienten, wobei der jüngste zum Entnahmezeitpunkt sieben Jahre und der älteste Patient 81 Jahre alt war.

4.2.1 Patientengruppen

Tabelle 4.2.1-1: Verteilung der Patienten je nach Diagnose

Diagnosen	Einteilung	Anzahl der Patienten
Erythema migrans (EM)	Eingeschlossen wurden alle Patienten, die mit einem Erythema migrans in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München diagnostiziert wurden.	34 (33,7 %)
Multiple Erythemata migrantia (MEM)	Zu dieser Auswahl wurden Patienten mit multiplen Erythemata migrantia eingeteilt.	2 (2 %)
Lymphozytom	Patienten mit einer Frühinfektion und dem Symptom Lymphozytom wurden hier eingeschlossen.	3 (3 %)
Neuroborreliose	Dieser Gruppe wurden diejenigen Patienten eingeteilt, die wegen einer Spätinfektion mit Neuroborreliose in die Klinik kamen.	1 (1 %)
Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	Eingeschlossen wurden alle Patienten mit einer gesicherten ACA-Diagnose.	15 (14,9 %)
Lyme-Arthritis	Zu dieser Auswahl wurden Patienten mit einer gesicherten Lyme-Arthritis-Diagnose eingeteilt.	19 (18,8 %)
Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss	Patienten, welche wegen Ausschlusses einer Borreliose-Infektion untersucht wurden, ohne letztliche Diagnose eines der oben genannten Symptome, wurden in dieser Gruppe zusammengefasst.	27 (26,7 %)

Ergebnisse

Die Gruppen 1-3 werden den Erkrankungen im Frühstadium zugeordnet. Die Gruppen 4-6 lassen sich zur Gruppe der Spätinfektionen zusammenfassen. Die letzte Gruppe nimmt als Kollektiv der Abklärungsfälle eine Sonderstellung ein.

Die Diagnose eines ECM war Grund für eine serologische Untersuchung bei 34 Patienten (34 %), die MEM bei 2 (2 %), die eines Lymphozytoms bei 3 (3 %), Neuroborreliose bei 1 (1 %), ACA bei 15 (14,9 %) und bei 19 Patienten konnte eine Lyme-Arthritis (18,8 %) nachgewiesen werden. Insgesamt wurden von allen Patienten 38,6 % mit Frühsymptomen der Lyme-Borreliose und 34,7 % mit Spätsymptomen diagnostiziert.

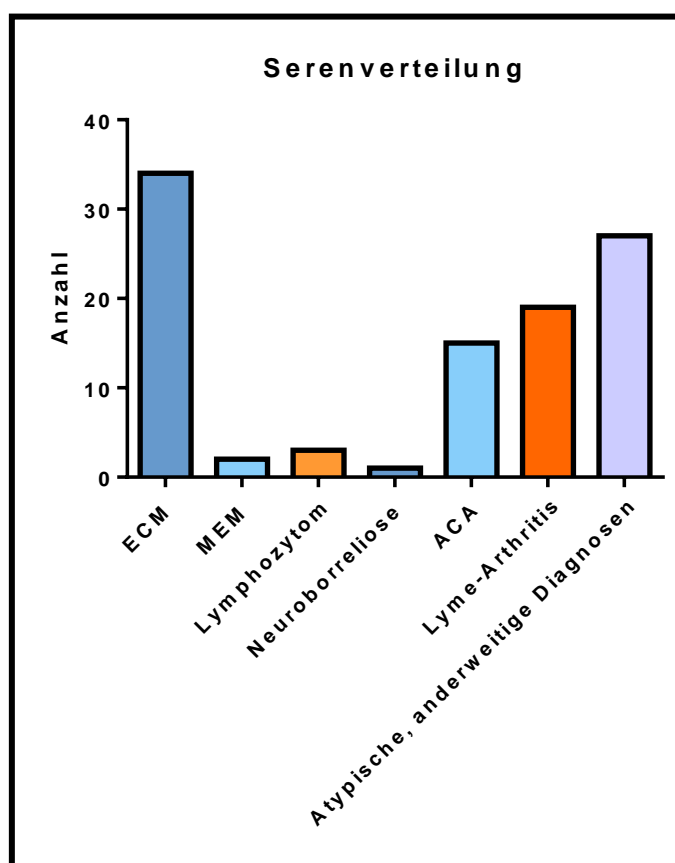


Abbildung 4.2.1-1: Serenverteilung je nach Diagnose

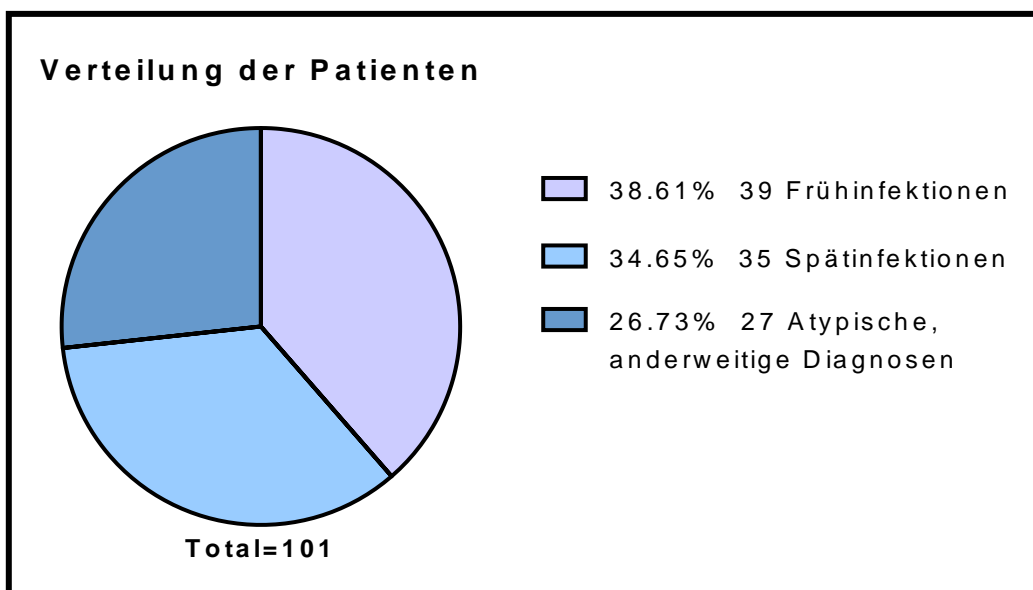


Abbildung 4.2.1-2: Patienteneinteilung je nach Diagnosegruppe

Bei den übrigen 27 Patienten (26,7 %) gab es unterschiedliche Gründe für die Untersuchung auf eine Lyme-Borreliose, die nicht mit den typischen Borreliosesymptomen übereinstimmen. Bei 13 (48,15 %) Patienten bestand ein Infektionsverdacht aufgrund eines Zeckenbisses und bei 14 (51,85 %) gab es keine Assoziation zu einem Zeckenbiss.

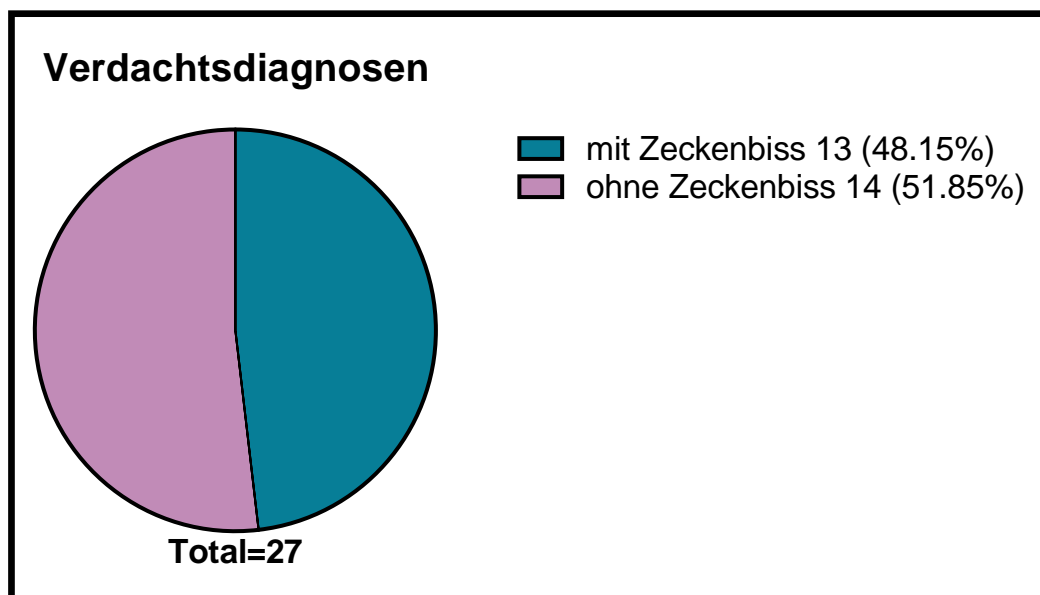


Abbildung 4.2.1-3: Verteilung der Patienten mit atypischen, anderweitigen Diagnosen mit oder ohne Zeckenbiss

Ergebnisse

Im Folgenden werden die Untersuchungsgründe für diese Patientengruppe dargestellt.

4.2.2 Serologischer Test ohne Assoziation zu Zeckenbiss:

Chronische Gelenkschmerzen

Infektassoziierte Urtikaria

Polyarthralgia unklarer Genese

Entzündliche Hautveränderung am Bein

Erythema anulare centrifugum

Ekchymathöse nummuläre Plaques am Integument und hyperkeratotisch-rhagadiformes Handekzem

Drei Stichstellen unklarer Herkunft und Erythem an einer anderen Stelle

Hautveränderung (kein EM) am Oberschenkel

Chronische Muskelatrophie

Rezidivierende Fieberschübe

Erysipelartige Rötung am Unterschenkel

Rötung und Schwellung am linken Fuß, dazu Verdacht auf Raynaud-Syndrom

Zirkumskripte Sklerodermie

4.2.3 Mit Zeckenbiss assoziierte atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss:

Multiple Zeckenbisse, multiple erythematöse Makulae

Ergebnisse

Chronische Muskelschmerzen, fünf Jahre zuvor durchgemachte und therapierte Lyme-Borreliose

Muskelschmerzen, zehn Jahre zuvor durchgemachte und therapierte Lyme-Borreliose

Multiple Zeckenstiche

zwei Jahre zuvor Zeckenbiss ohne Symptome, angegeben wurde ein Taubheitsgefühl der linken Gesichtshälfte

Zwei Monate zuvor Zeckenbiss ohne Symptome

Zwei Wochen zuvor Zeckenbiss mit folgender Grippe-symptomatik

Vier Wochen zuvor Zeckenbiss mit Rötung in der Leiste

Ein Jahr zuvor Zeckenbiss mit folgender Grippe-symptomatik

Fibromyalgie

Myalgie

Verdacht auf Zeckenbiss

Verdacht auf Zeckenbiss

Verdacht auf Zeckenbiss

4.3 Serologische Ergebnisse im Vergleich

4.3.1 Kompletter Serensatz: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 75,3 % (76) aller Seren positiv, 3,9 % (4) grenzwertig und 20,8 % (21) negativ. Die **IgG-VlsE**-Bande war in 77,2 % (78) der Fälle positiv und in 22,8 % (23) negativ. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 34,7 % (35) positiv und bei 65,3 % (66) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 34,7 % (35) positiv und bei 65,3 % (66) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 22,8 % (23) der Frühinfektionsfälle positiv, bei 5,9 % (6) grenzwertig und bei 71,3 % (72) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 16,8 % (17) der Proben positiv und bei 83,2 % (84) negativ.

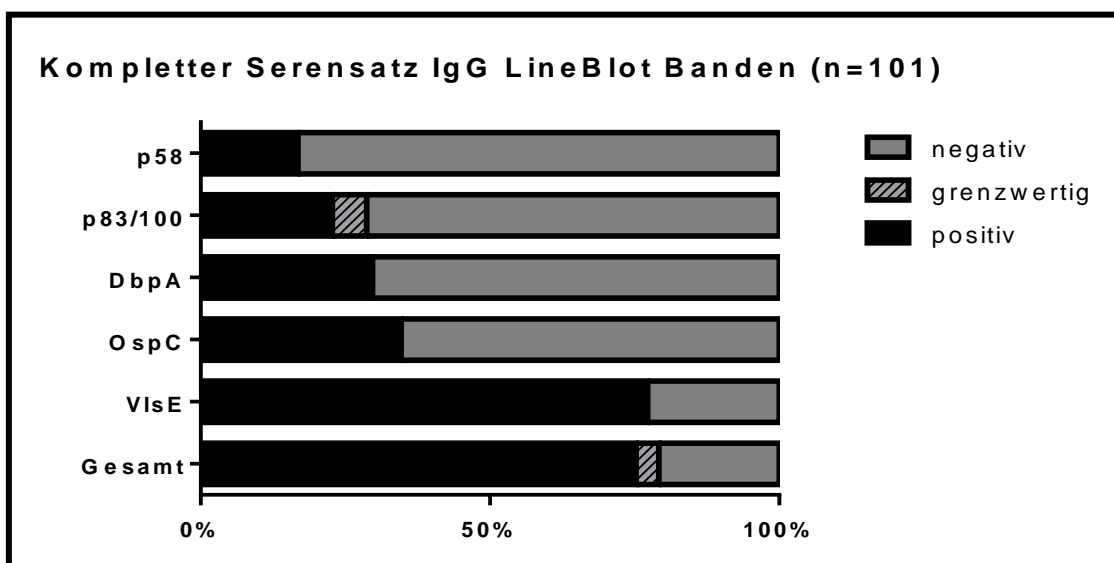


Abbildung 4.3.1-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse vom kompletten Serensatz

4.3.2 Kompletter Serensatz: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 62,4 % (63) aller Seren positiv, 14,9 % (15) grenzwertig und 22,8 % (23) negativ. Der **IgG-VlsE**-Analyt war in 70,3 % (71) der Fälle positiv, in 2 % (2) grenzwertig und in 27,7 % (28) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 20,8 % (21) positiv, bei 4 % (4) grenzwertig und bei 75,2 % (76) negativ. Der **IgG-**

Ergebnisse

DbpA-Analyt war bei 38,6 % (39) positiv, bei 2 % (2) grenzwertig und bei 59,4 % (60) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 13,9 % (14) der Frühinfektionsfälle positiv, bei 7,9 % (8) grenzwertig und bei 78,2 % (79) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 9,9 % (10) der Proben positiv, bei 4 % (4) grenzwertig und bei 86,1 % (87) negativ.

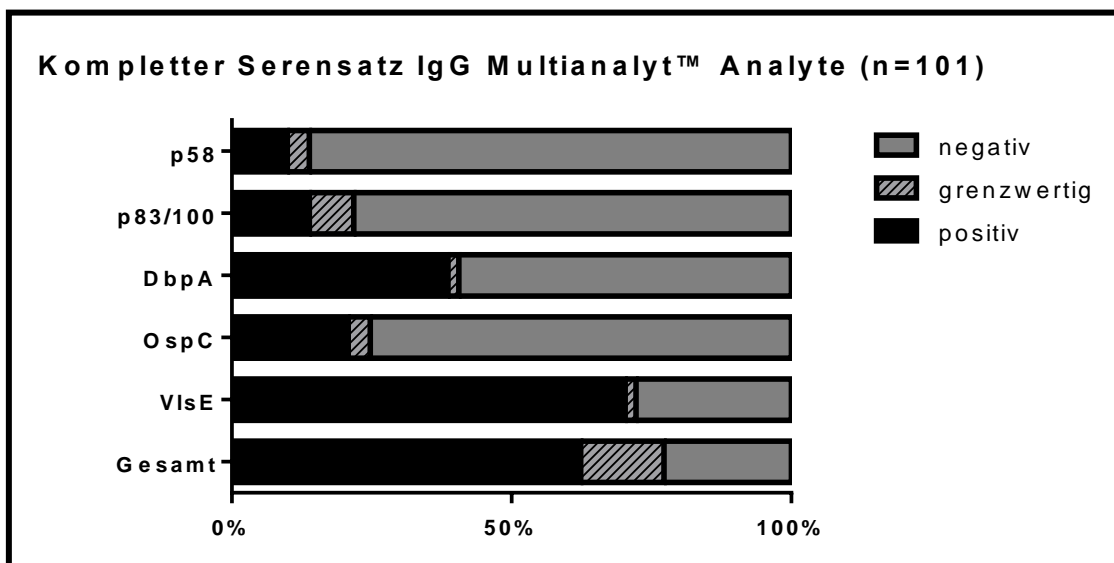


Abbildung 4.3.2-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse vom kompletten Serensatz

4.3.3 Kompletter Serensatz: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** aller **IgG-Seren** eine Rate von 81,2 % (82) übereinstimmenden, 3,9 % (4) unterschiedlichen und 14,9 % (15) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 90,1 % (91) übereinstimmenden, 7,9 % (8) unterschiedlichen und 2 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Bei der Übereinstimmung für **OspC IgG** fanden sich 73,3 % (74) übereinstimmende, 22,8 % (23) unterschiedliche und 3,9 % (4) grenzwertige Ergebnisse.

Bei der Übereinstimmung für **DbpA IgG** fanden sich 62,4 % (63) übereinstimmende,

Ergebnisse

35,6 % (36) unterschiedliche und 2 % (2) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden im Vergleich ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 83,2 % (84) übereinstimmenden, 8,9 % (9) unterschiedlichen und 7,9 % (8) grenzwertigen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 87,1 % (88). Bei 8,9 % (9) gab es keine Übereinstimmung und 4 % (4) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

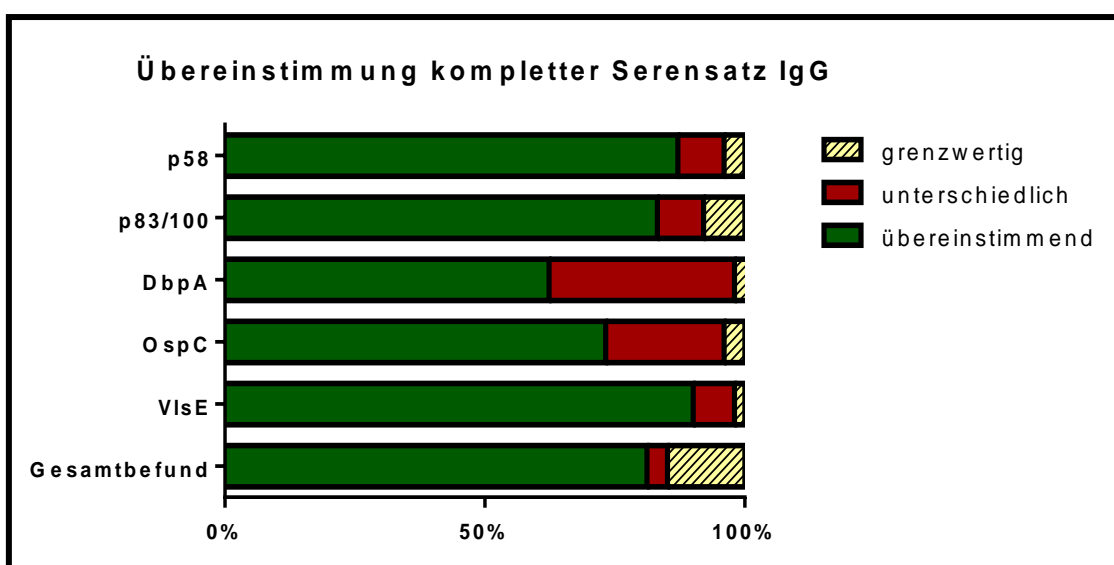


Abbildung 4.3.3-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden vom kompletten Serensatz

4.3.4 Kompletter Serensatz: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 53,9 % (56) aller Seren positiv und 46,1 % (45) negativ. Die **IgM-VisE**-Bande war in 5,9 % (6) der Fälle positiv und in 94,1 % (95) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war in 45,6 % (46) der Fälle positiv, in 1 % (1) grenzwertig und in 53,5 % (54) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 60,4 % (61) der untersuchten Frühinfektionen positiv und bei 39,6 % (40) negativ.

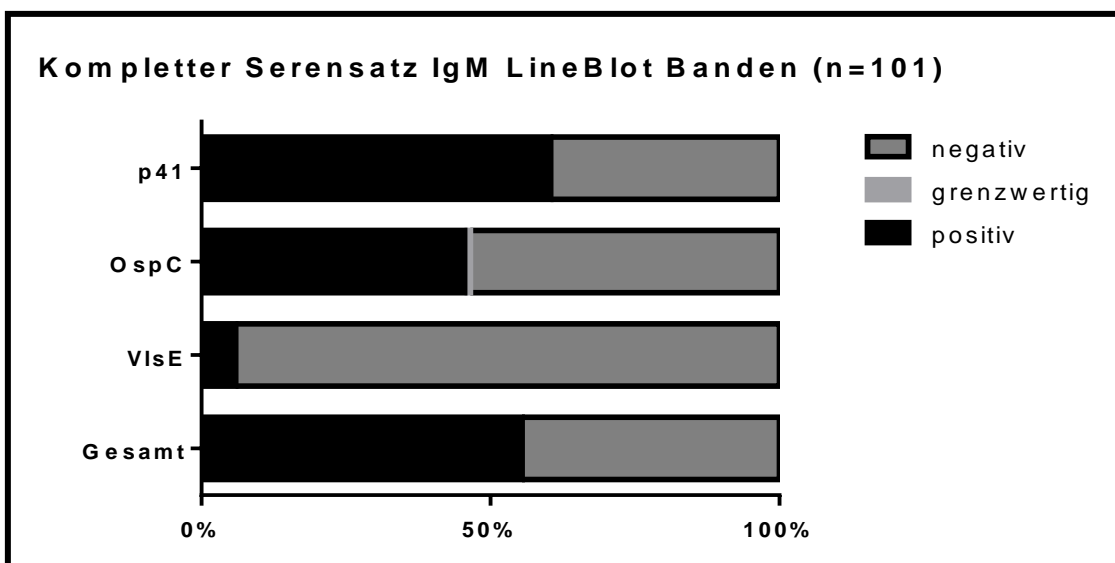


Abbildung 4.3.4-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse vom kompletten Serensatz

4.3.5 Kompletter Serensatz: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 34,7 % (35) aller Proben positiv, 3 % (3) grenzwertig und 62,4 % (63) negativ. Der **IgM-VlsE**-Analyt war bei 3 % (3) positiv, bei 6,9 % (7) grenzwertig und bei 90,1 % (91) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war für 34,7 % (35) positiv, bei 3 % (3) grenzwertig und bei 62,4 % (63) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 1 % (1) der Frühinfektionsseren grenzwertig und bei 99 % (100) negativ.

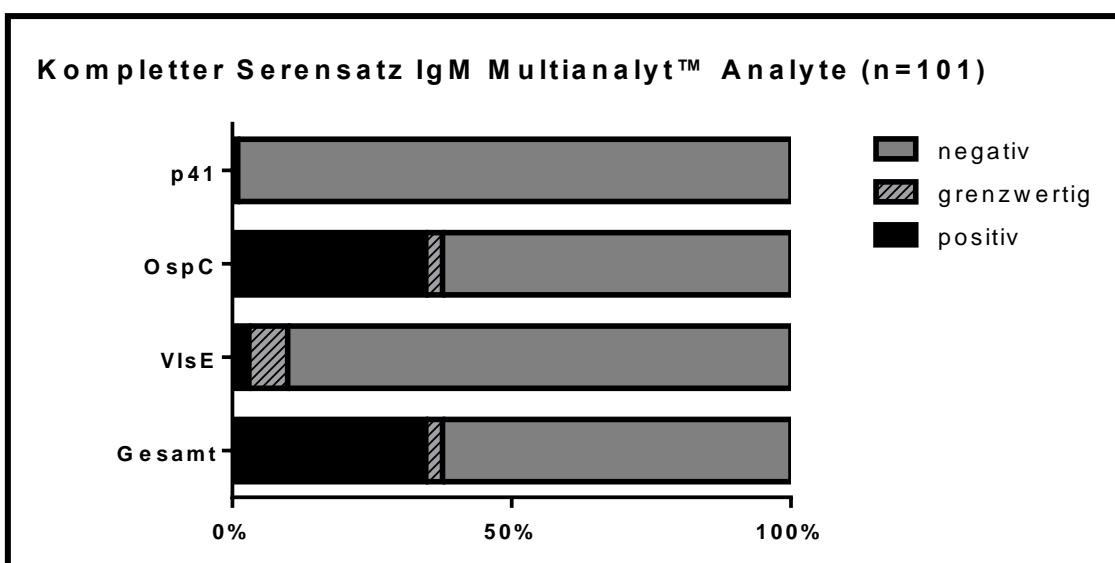


Abbildung 4.3.5-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse vom kompletten Serensatz

4.3.6 Kompletter Serensatz: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** aller **IgM-Seren** eine Rate von 77,2 % (78) übereinstimmenden, 19,8 % (20) unterschiedlichen und 3 % (3) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 86,1 % (87) übereinstimmende, 6,9 % (7) unterschiedliche und 6,9 % (7) grenzwertige Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 83,1 % (84). Bei 13,9 % (14) gab es keine Übereinstimmung und 3 % (3) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 37,6 % (38) übereinstimmenden, 61,4 % (62) unterschiedlichen und 1 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

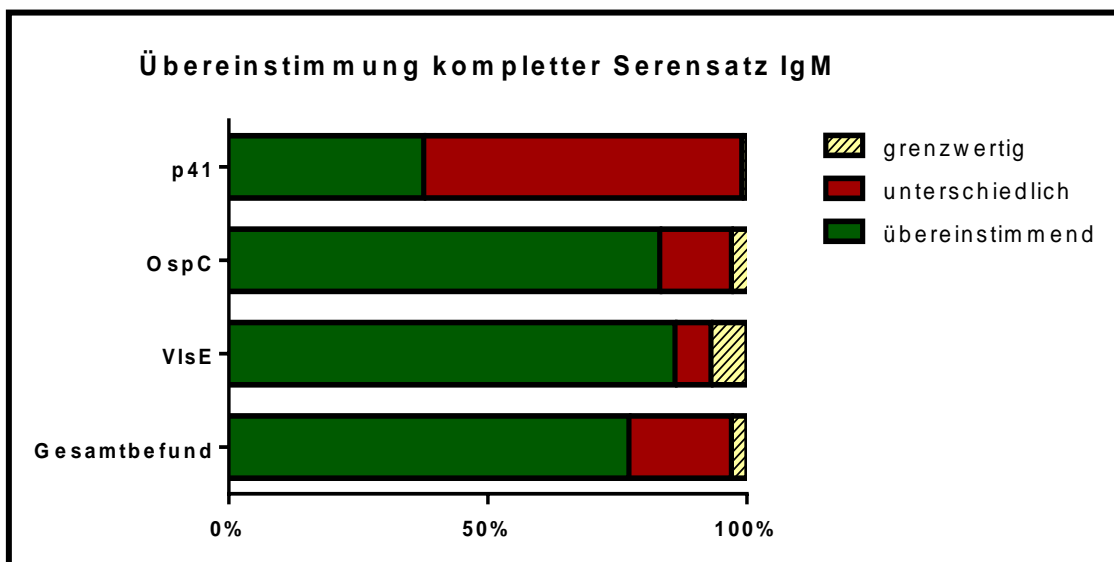


Abbildung 4.3.6-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden vom kompletten Serensatz

4.3.7 Frühinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 79,5 % (31) der Frühinfektionsseren positiv, 2,6 % (1) grenzwertig und 17,9 % (7) negativ. Die **IgG-VisE**-Bande war in 79,5 % (31) der Fälle positiv und in 20,5 % (8) negativ. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 43,6 % (17) positiv und bei 56,4 % (22) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 20,8 % (9) positiv und bei 79,2 % (30) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 2,6 % (1) der Frühinfektionsfälle positiv und bei 97,4 % (38) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 5,1 % (2) der Proben positiv und bei 94,9 % (37) negativ.

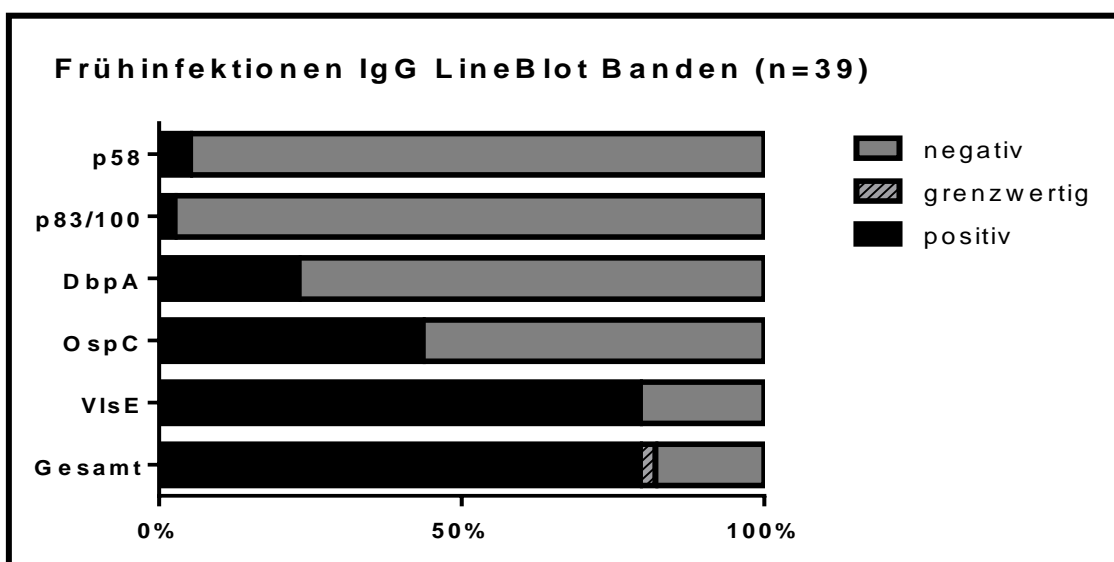


Abbildung 4.3.7-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der Frühinfektionsseren

4.3.8 Frühinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 61,5 % (24) der Frühinfektionsseren positiv, 20,5 % (8) grenzwertig und 18 % (7) negativ. Der **IgG-VisE**-Analyt war in 69,2 % (27) der Fälle positiv, in 2,6 % (1) grenzwertig und in 28,2 % (11) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 28,2 % (11) positiv, bei 2,6 % (1) grenzwertig und bei 69,2 % (27) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 25,6 % (10) positiv, bei 2,6 % (1) grenzwertig und bei 71,8 % (28) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 10,3 % (4) der Frühinfektionsfälle

Ergebnisse

positiv, bei 7,7 % (3) grenzwertig und bei 82,1 % (32) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 5,1 % (2) der Proben positiv und bei 94,9 % (37) negativ.

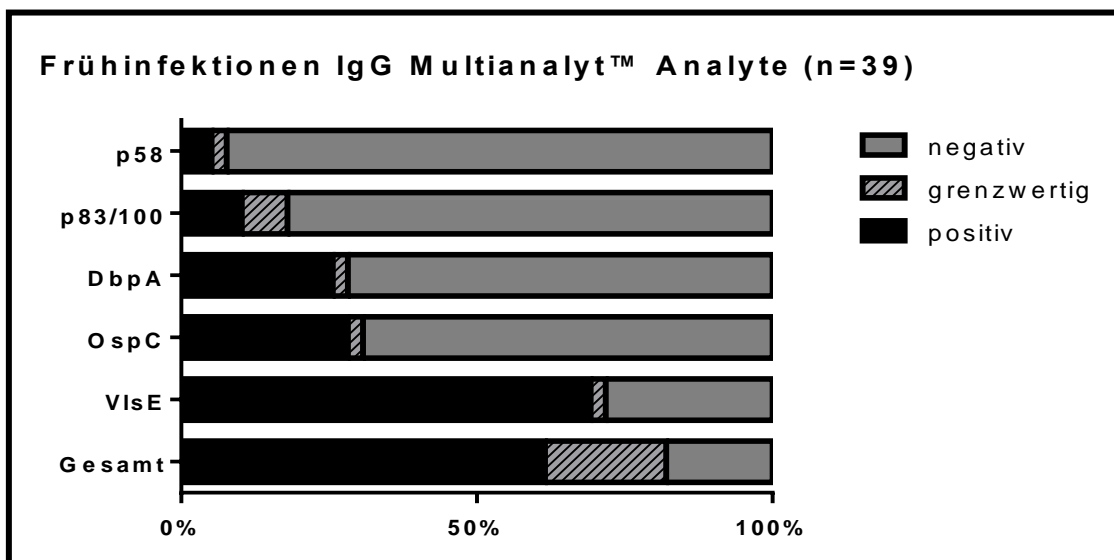


Abbildung 4.3.8-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der Frühinfektionsseren

4.3.9 Frühinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Frühstadien **IgG-Seren** eine Rate von 76,9 % (30) übereinstimmenden und 23,1 % (9) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 84,6 % (33) übereinstimmenden, 12,8 % (5) unterschiedlichen und 2,6 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 79,5 % (31) übereinstimmende, 18 % (7) unterschiedliche und 2,6 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 69,2 % (27) übereinstimmende, 28,2 % (11) unterschiedliche und 2,6 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 89,6 % (35) übereinstimmenden, 5,1 % (2) grenzwertigen und 5,1% (2)

Ergebnisse

unterschiedlichen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 94,9 % (37). Bei 2,6 % (1) gab es keine Übereinstimmung und 2,6 % (1) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

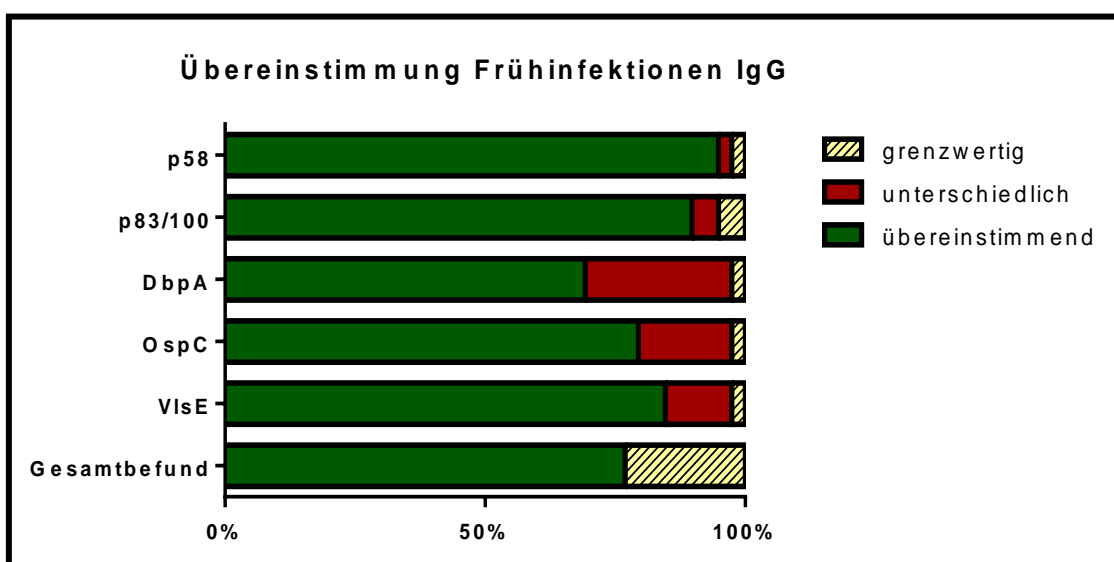


Abbildung 4.3.9-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Frühinfektionsseren

4.3.10 Frühinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 53,9 % (21) der Frühinfektionsfälle positiv und 46,1 % (18) negativ. Die **IgM-VlsE**-Bande war in 7,7 % (3) der Fälle positiv und in 92,3 % (36) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war in 43,6 % (17) der Fälle positiv und in 56,4 % (22) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 59 % (23) der untersuchten Frühinfektionen positiv und bei 41 % (16) negativ.

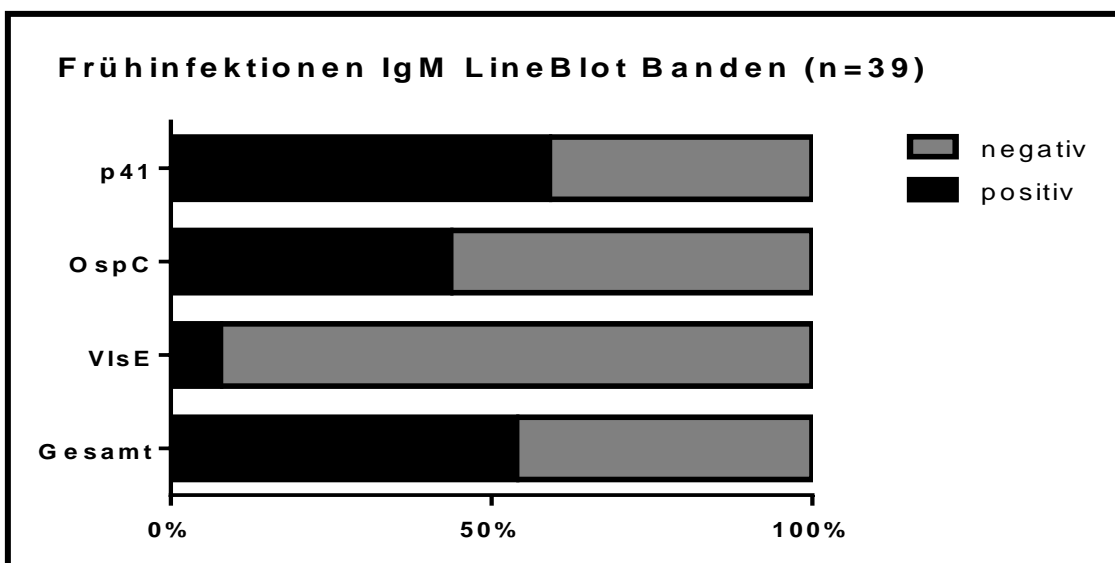


Abbildung 4.3.10-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der Frühinfektionsseren

4.3.11 Frühinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 35,9 % (14) der Frühinfektionsfälle positiv, 2,6 % (1) grenzwertig und 61,5 % (24) negativ. Der **IgM-VlsE-Analyt** war bei 2,6 % (1) positiv, bei 7,8 % (3) grenzwertig und bei 89,7 % (35) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war 35,9 % (14) positiv und bei 64,1 % (25) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 2,6 % (1) der Frühinfektionsseren positiv und bei 97,4 % (38) negativ.

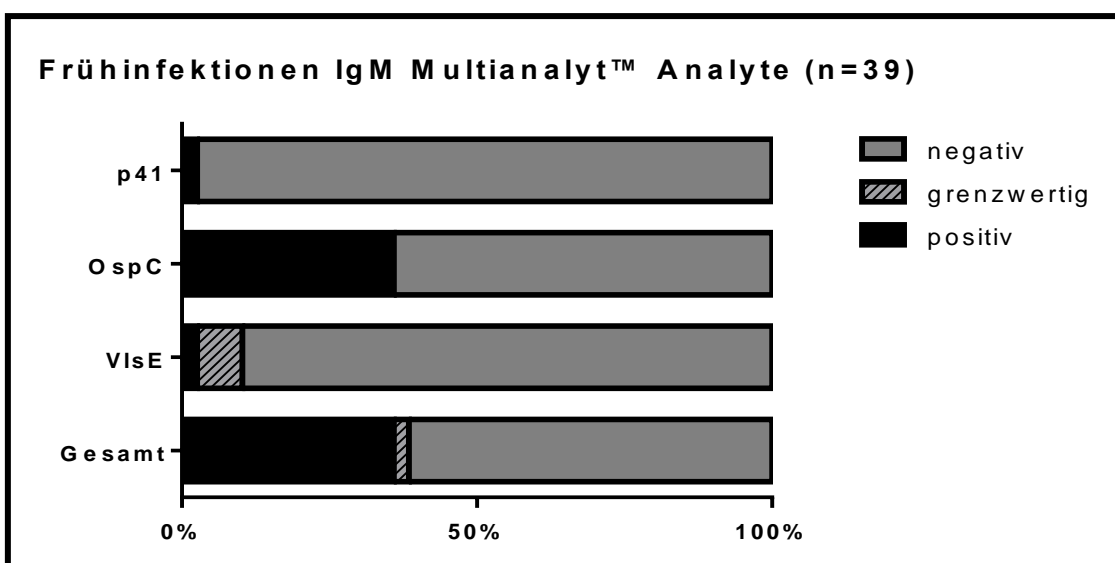


Abbildung 4.3.11-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der Frühinfektionsseren

4.3.12 Frühinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Frühinfektions-**IgM-Seren** eine Rate von 82,1 % (32) übereinstimmenden, 15,4 % (6) unterschiedlichen und 2,6 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 87,2 % (34) übereinstimmende, 5,1 % (2) unterschiedliche und 7,7 % (3) grenzwertige Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 92,3 % (36). Bei 7,7 % (3) gab es keine übereinstimmenden Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 41 % (16) übereinstimmenden und 59 % (23) unterschiedlichen Ergebnissen.

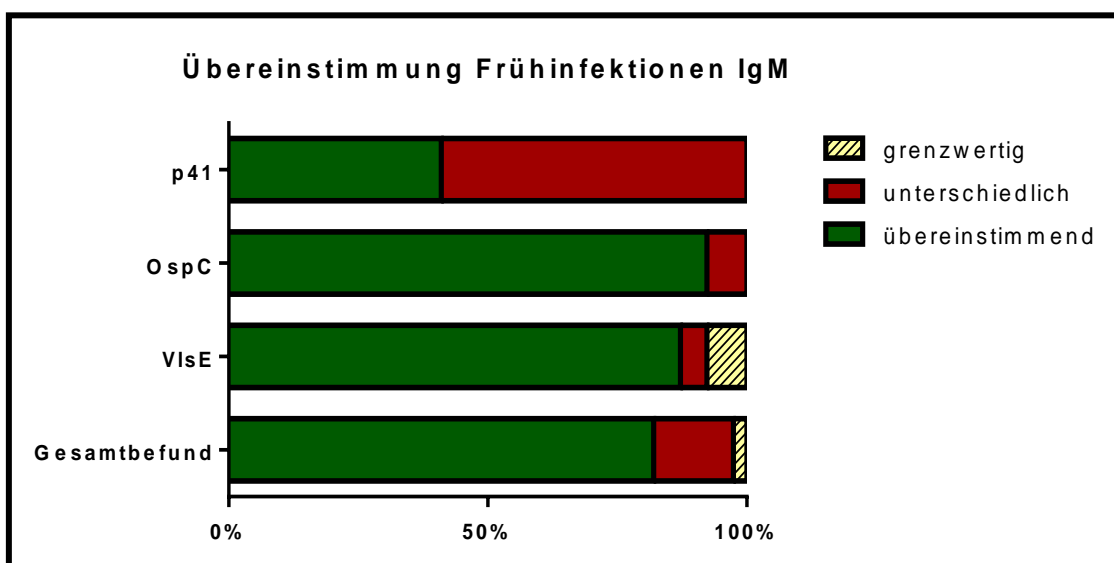


Abbildung 4.3.12-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der Frühinfektionsseren

4.3.13 ECM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG** LineBlot waren 79,4 % (27) der ECM-Seren positiv, 2,9 % (1) grenzwertig und 17,7 % (6) negativ. Die **IgG-VisE**-Bande war in 82,4 % (28) der Fälle

Ergebnisse

positiv und in 17,6 % (6) negativ. Die Bande für **IgG OspC** war in 44,1 % (15) der Fälle positiv und in 55,9 % (19) negativ. Im LineBlot war **IgG DbpA** bei 17,7 % (6) der untersuchten ECM-Fälle positiv und bei 82,3 % (28) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 100 % (34) negativ. Die Bande für **IgG p58** war bei 2,9 % (1) positiv und bei 97,1 % (33) negativ.

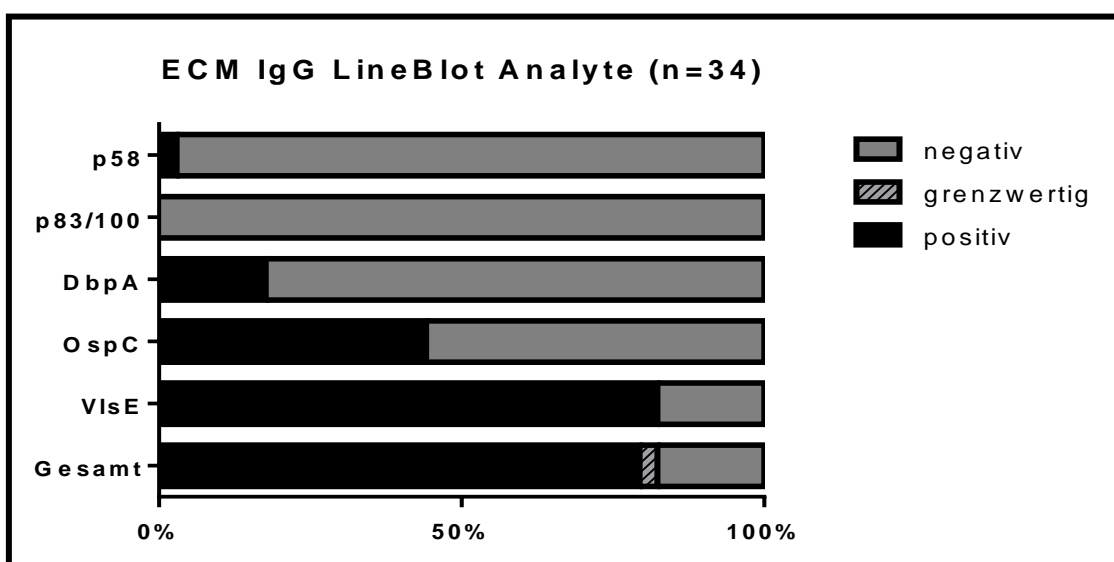


Abbildung 4.3.13-1: IgG-Immuno blot-Ergebnisse der ECM-Seren

4.3.14 ECM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 61,8 % (21) der ECM-Seren positiv, 20,6 % (7) grenzwertig und 17,7 % (6) negativ. Der **IgG-VlsE**-Analyt war in 70,6 % (24) der Fälle positiv, in 2,9 % (1) grenzwertig und in 26,5 % (9) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 29,4 % (10) positiv, bei 2,9 % (1) grenzwertig und bei 67,7 % (23) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 26,5 % (9) positiv, bei 2,9 % (1) grenzwertig und bei 70,6 % (24) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 5,9 % (2) der ECM-Fälle positiv, bei 8,8 % (3) grenzwertig und bei 85,3 % (29) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 2,9 % (1) der Proben grenzwertig und bei 97,1 % (33) negativ.

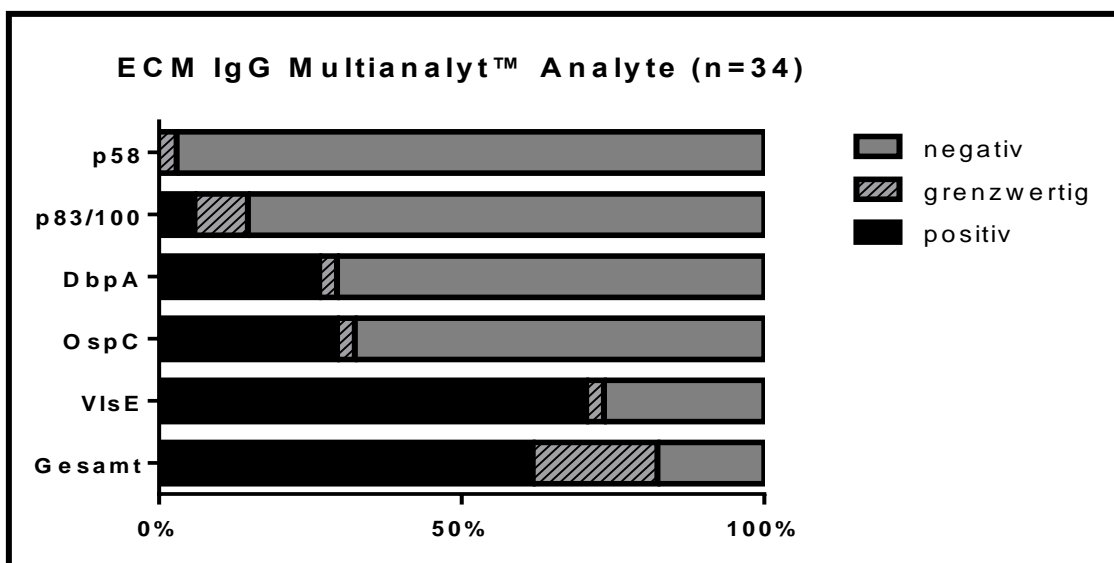


Abbildung 4.3.14-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der ECM-Seren

4.3.15 ECM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG- Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der ECM-IgG-Seren eine Rate von 76,5 % (26) übereinstimmenden und 23,5 % (8) grenzwertigen Ergebnissen. Die getesteten Seren stammten von Patienten mit gesicherten ECM Diagnosen, welche die charakteristischen Hautveränderungen zeigten.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 82,4 % (28) übereinstimmenden, 14,7 % (5) unterschiedlichen und 2,9 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 79,4 % (27) übereinstimmende, 17,7 % (6) unterschiedliche und 2,9 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 73,5% (25) übereinstimmende, 23,5% (8) unterschiedliche und 2,9% (1) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 85,4 % (30) übereinstimmenden, 4,2 % (2) unterschiedlichen und 10,4 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Ergebnisse

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 94,1 % (32). Bei 2,9 % (1) gab es keine Übereinstimmung und 2,9 % (1) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

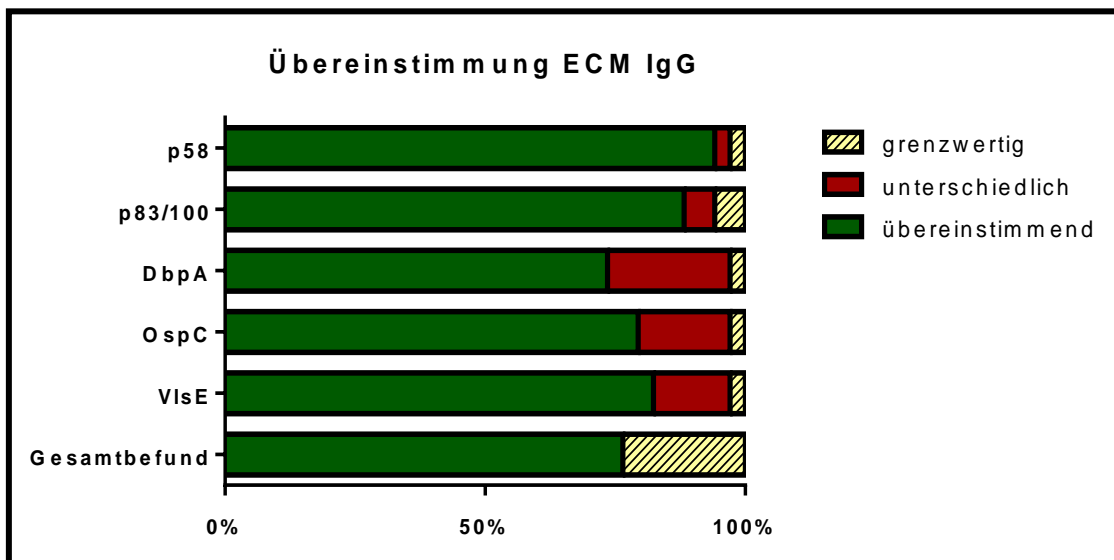


Abbildung 4.3.15-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der ECM-Seren

4.3.16 ECM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 55,9 % (19) der ECM-Fälle positiv und 44,1 % (15) negativ. Die **IgM-VlsE**-Bande war in 8,8 % (3) der Fälle positiv und in 91,2 % (31) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war in 44,1 % (15) der Fälle positiv und in 55,9 % (19) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 58,8 % (20) der untersuchten ECM-Seren positiv und bei 41,2 % (14) negativ.

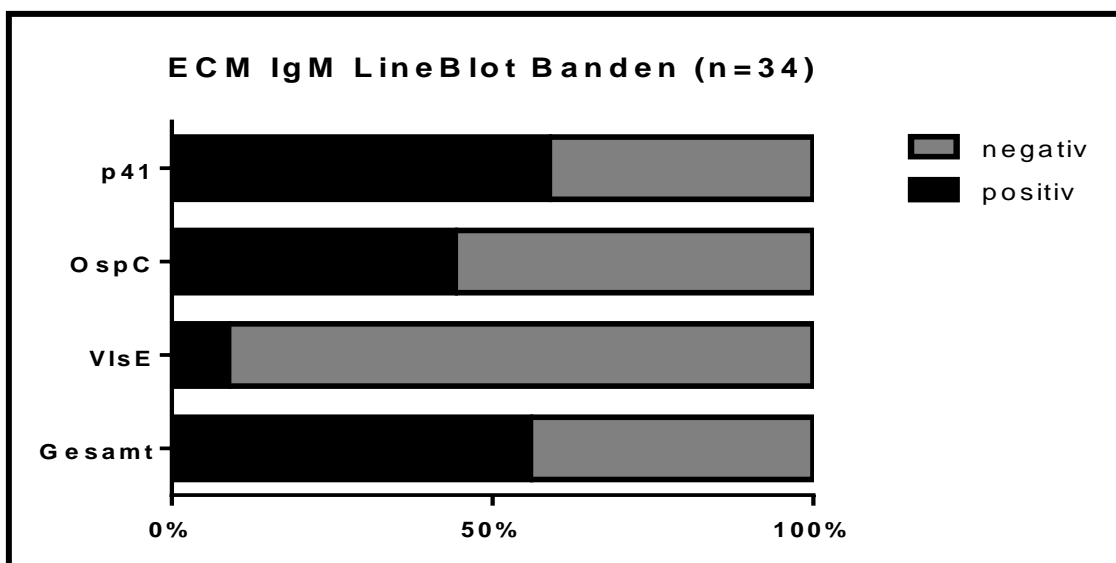


Abbildung 4.3.16-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der ECM-Seren

4.3.17 ECM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 38,2 % (13) der ECM-Fälle positiv, 2,9 % (1) grenzwertig und 58,8 % (20) negativ. Der **IgM-VisE**-Analyt war bei 8,8 % (3) grenzwertig und bei 91,2 % (31) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war bei 38,2 % (13) positiv und bei 61,8 % (21) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 100 % (34) der ECM-Seren negativ.

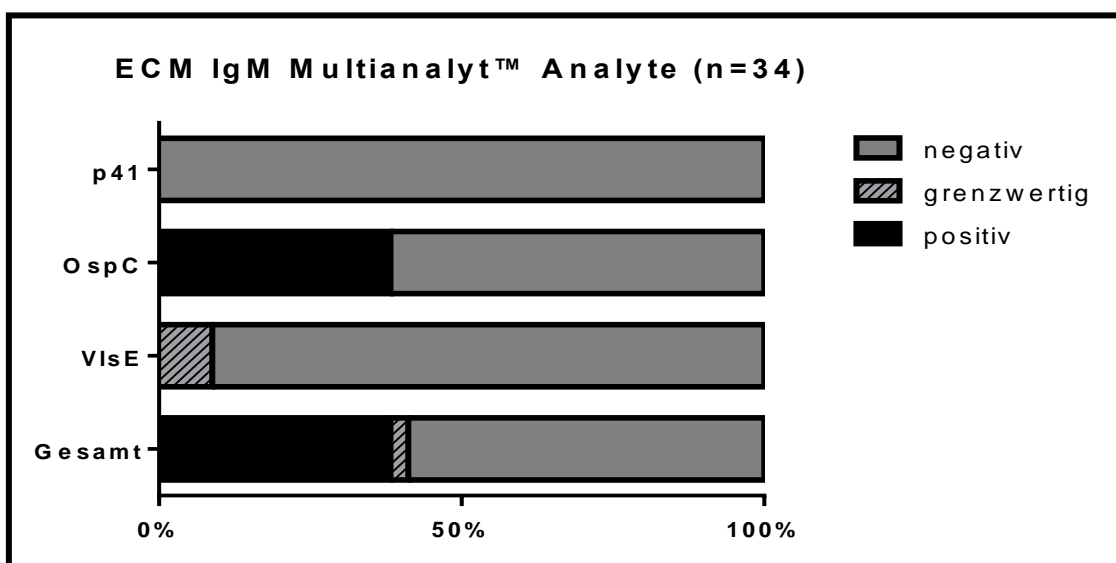


Abbildung 4.3.17-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse der ECM-Seren

4.3.18 ECM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der ECM-IgM-Seren eine Rate von 82,4 % (28) übereinstimmenden, 14,7 % (5) unterschiedlichen und 2,9 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 88,2 % (30) übereinstimmende, 2,9 % (1) unterschiedliche und 8,8 % (3) grenzwertige Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 94,1 % (32). Bei 5,9 % (2) gab es keine übereinstimmenden Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 44,1 % (15) übereinstimmenden und 55,9 % (19) unterschiedlichen Ergebnissen.

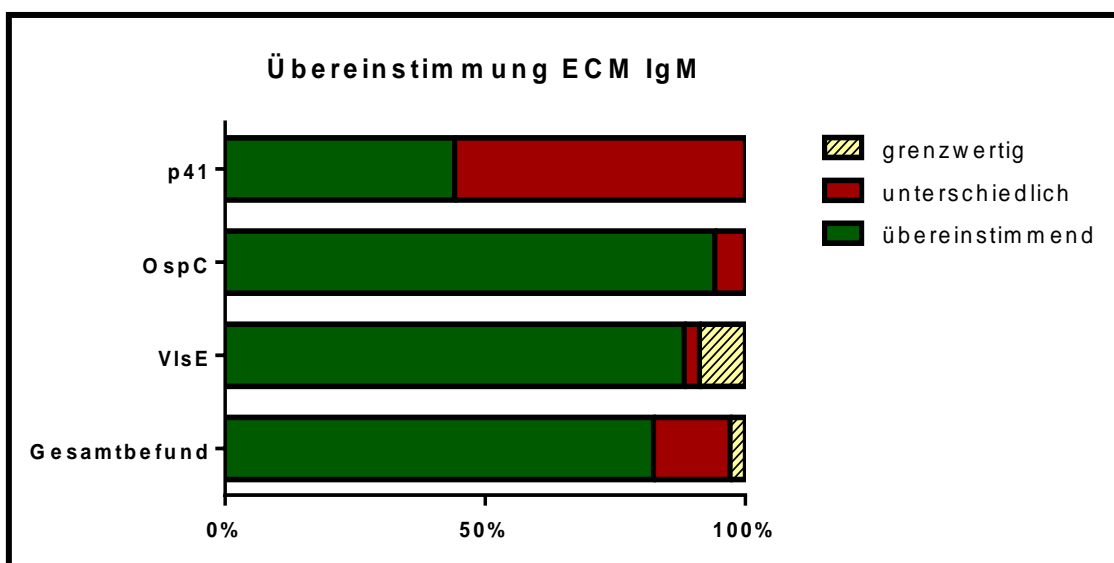


Abbildung 4.3.18 -1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der ECM-Seren

4.3.19 MEM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 100 % (2) der MEM-Seren positiv. Die **IgG-VisE**-Bande war in 100 % (2) der Fälle positiv. Die Bande für **IgG OspC** war in 50 % (1)

Ergebnisse

der Fälle positiv und in 50 % (1) negativ. Im LineBlot war **IgG DbpA** bei 50 % (1) der untersuchten MEM-Fälle positiv und bei 50 % (1) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 50 % (1) der Fälle positiv und bei 50 % (1) negativ. Bei den analysierten MEM-Seren war die Bande für **IgG p58** bei 50 % (1) positiv und bei 50 % (1) negativ.

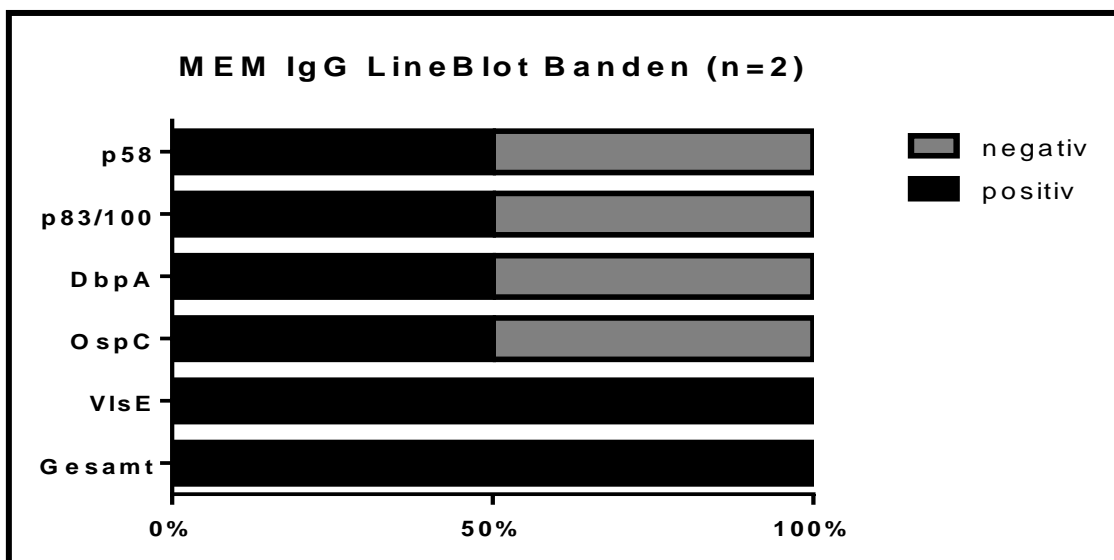


Abbildung 4.3.19-1: IgG-Immuno blot-Ergebnisse der MEM-Seren

4.3.20 MEM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 100 % (2) der MEM-Seren positiv. Der **IgG-VlsE**-Analyt war in 100 % (2) der Fälle positiv. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 50 % (1) positiv und bei 50 % (1) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 50 % (1) positiv, bei 50 % (1) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 50 % (1) der MEM-Fälle positiv und bei 50 % (1) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 50 % (1) positiv, bei 50 % (1) negativ.

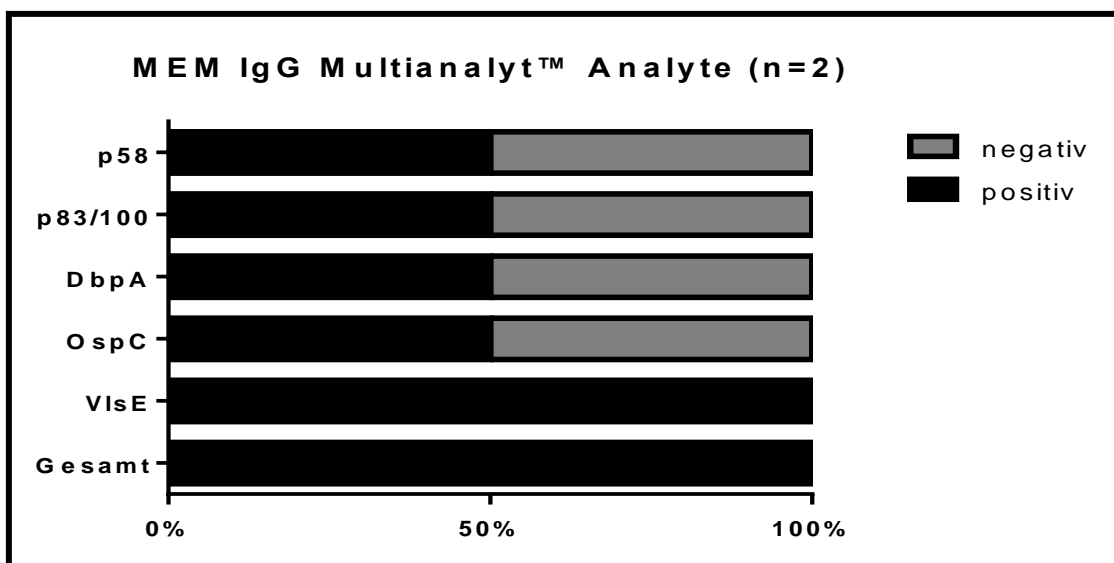


Abbildung 4.3.20-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der MEM-Seren

4.3.21 MEM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der MEM-IgG-Seren eine Rate von 100 % (2) übereinstimmenden Ergebnissen. Die getesteten Seren stammten von Patienten mit gesicherten MEM Diagnosen, welche die charakteristischen Hautveränderungen zeigten.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 100 % (2) übereinstimmenden Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 100 % (2) übereinstimmende Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 100 % (2) unterschiedliche Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 100 % (2) übereinstimmenden Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 100 % (2).

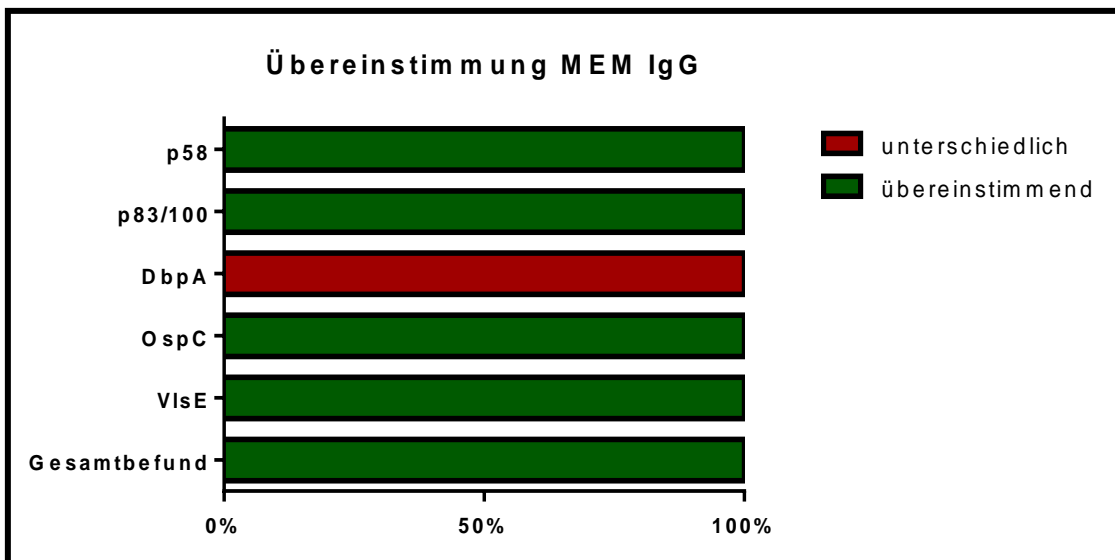


Abbildung 4.3.21-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der MEM-Seren

4.3.22 MEM: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 50 % (1) der MEM-Fälle positiv und 50 % (1) negativ. Die **IgM-VlsE**-Bande war in 100 % (2) der Fälle negativ. Die Bande für **IgM OspC** war in 50 % (1) der Fälle positiv und in 50 % (1) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 100 % (2) untersuchten MEM-Seren positiv.

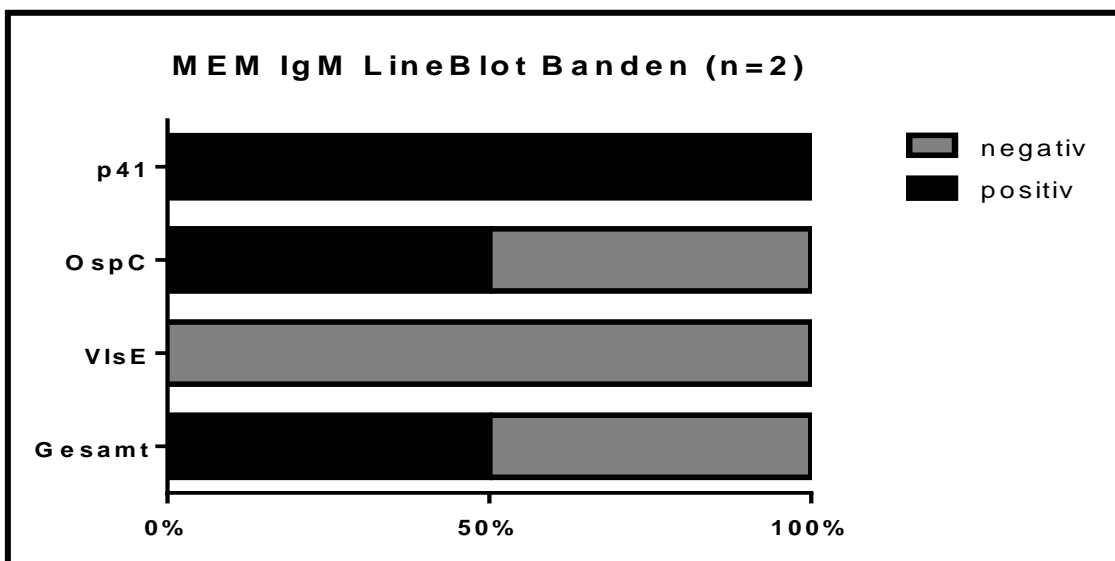


Abbildung 4.3.22-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der MEM-Seren

4.3.23 MEM: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 50 % (1) der MEM-Fälle positiv und 50 % (1) negativ. Der **IgM-VisE-Analyt** war bei 50 % (1) positiv und bei 50 % (1) negativ. Die Analyt für **IgM OspC** war bei 50 % (1) positiv und bei 50 % (1) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 100 % (2) der MEM-Seren negativ.

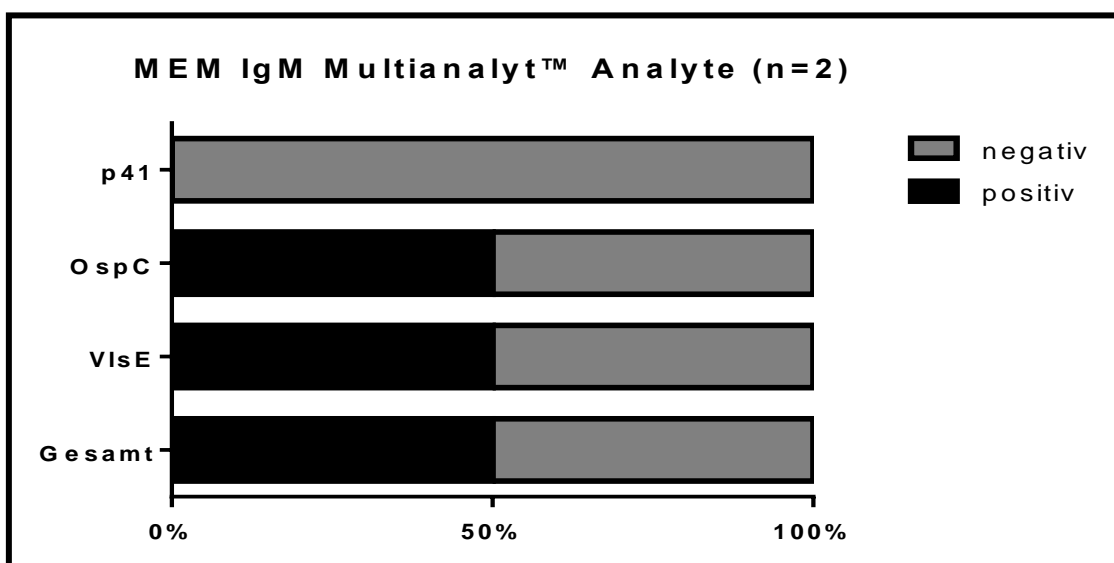


Abbildung 4.3.23-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse der MEM-Seren

4.3.24 MEM: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der MEM-IgM-Seren eine Rate von 100 % (2) übereinstimmenden Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fand sich zu 50 % (1) ein übereinstimmendes und zu 50 % (1) ein unterschiedliches Ergebnis.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 100 % (2).

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 100 % (2) unterschiedlichen Ergebnissen.

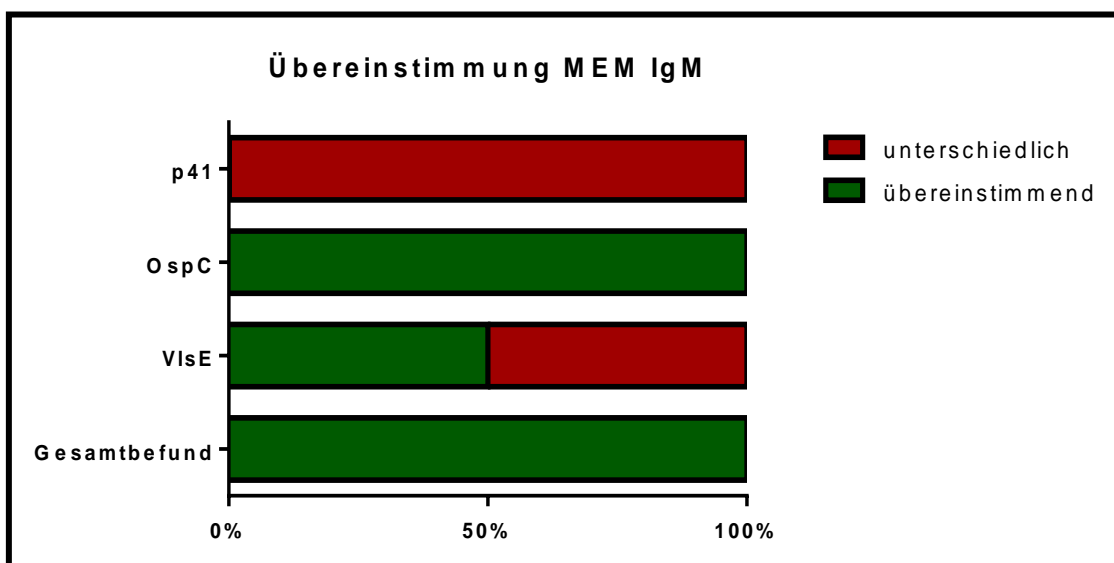


Abbildung 4.3.24-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der MEM-Seren

4.3.25 Lymphozytom: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 66,7 % (2) der Lymphozytom-Seren positiv und 33,3 % (1) negativ. Die **IgG-VisE**-Bande war bei 33,3 % (1) der Fälle positiv und bei 66,7 % (2) negativ. Die Bande für **IgG OspC** war in 33,3 % (1) der Fälle positiv und in 66,7 % (2) negativ. Im LineBlot war **IgG DbpA** bei 66,7 % (2) der untersuchten Lymphozytom-Fälle positiv und bei 33,3 % (1) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 100 % (3) der Fälle negativ. Bei den analysierten Lymphozytom-Seren war die Bande für **IgG p58** bei 100 % (3) negativ.

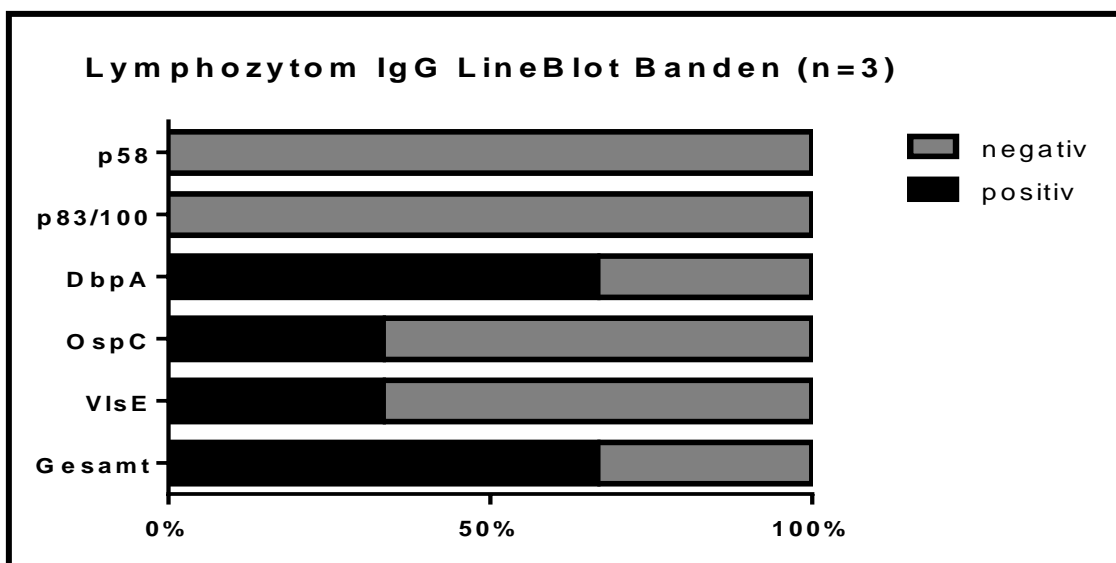


Abbildung 4.3.25-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der Lymphozytom-Seren

4.3.26 Lymphozytom: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 33,3 % (1) der Lymphozytom-Seren positiv, 33,3 % (1) grenzwertig und 33,3 % (1) negativ. Der **IgG-VlsE**-Analyt war in 33,3 % (1) der Fälle positiv und bei 66,7 % (2) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 100 % (3) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 100 % (3) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 33,3 % (1) der Lymphozytom-Fälle positiv und bei 66,7 % (2) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 33,3 % (1) positiv und bei 66,7 % (2) negativ.

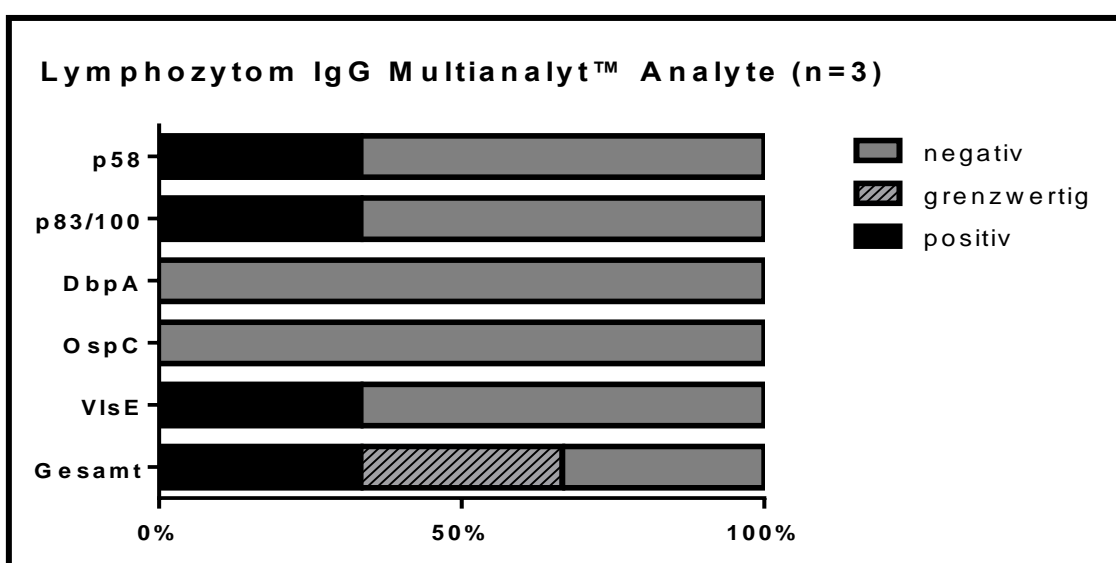


Abbildung 4.3.26-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der MEM-Seren

4.3.27 Lymphozytom: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Lymphozytom-**IgG-Seren** eine Rate von 66,6 % (2) übereinstimmenden und 33,3 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VisE IgG** eine Rate von 100 % (3) übereinstimmenden Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 66,6 % (2) übereinstimmende und 33,3 % (1) unterschiedliche Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 66,6 % (2) übereinstimmende und 33,3 % (1) unterschiedliche Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 100 % (3) übereinstimmenden Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 100 % (3).

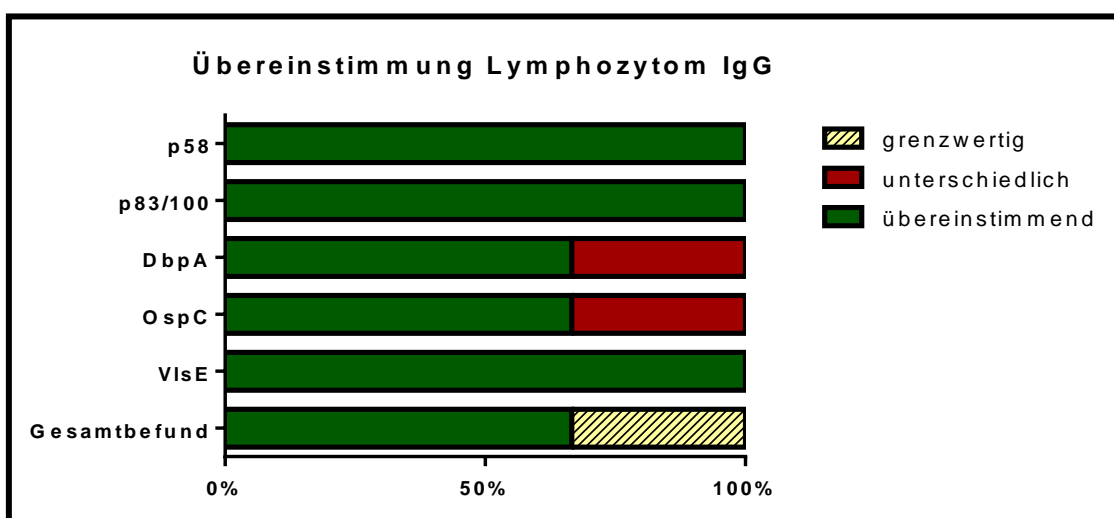


Abbildung 4.3.27-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Lymphozytom-Seren

4.3.28 Lymphozytom: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 33,3 % (1) der Lymphozytom-Fälle positiv und 66,7 % (2) negativ. Die **IgM-VisE**-Bande war in 100 % (3) der Fälle negativ. Die Bande für **IgM OspC** war in 33,3 % (1) der Fälle positiv und in 66,7 % (2) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 33,3 % (1) der untersuchten Lymphozytom-Seren positiv und bei 66,7 % (2) negativ.

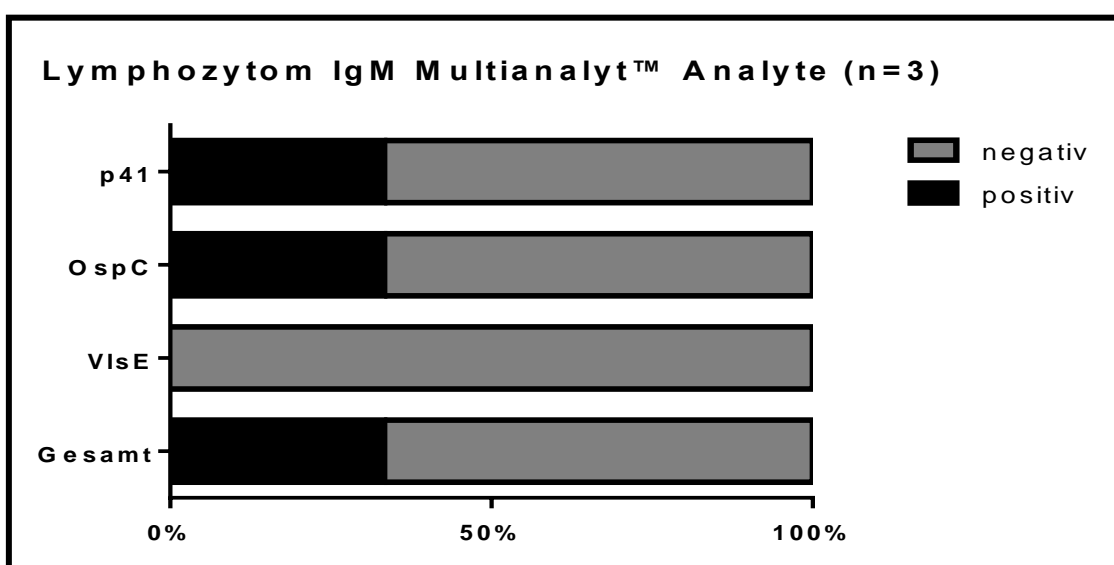


Abbildung 4.3.28-1: IgM-Immunoassay-Ergebnisse der Lymphozytom-Seren

4.3.29 Lymphozytom: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 100 % (3) der Lymphozytom-Fälle negativ. Der **IgM-VisE**-Analyt war bei 100 % (3) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war 100 % (3) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 33,3 % (1) der Lymphozytom-Seren positiv und bei 66,7 % (2) negativ.

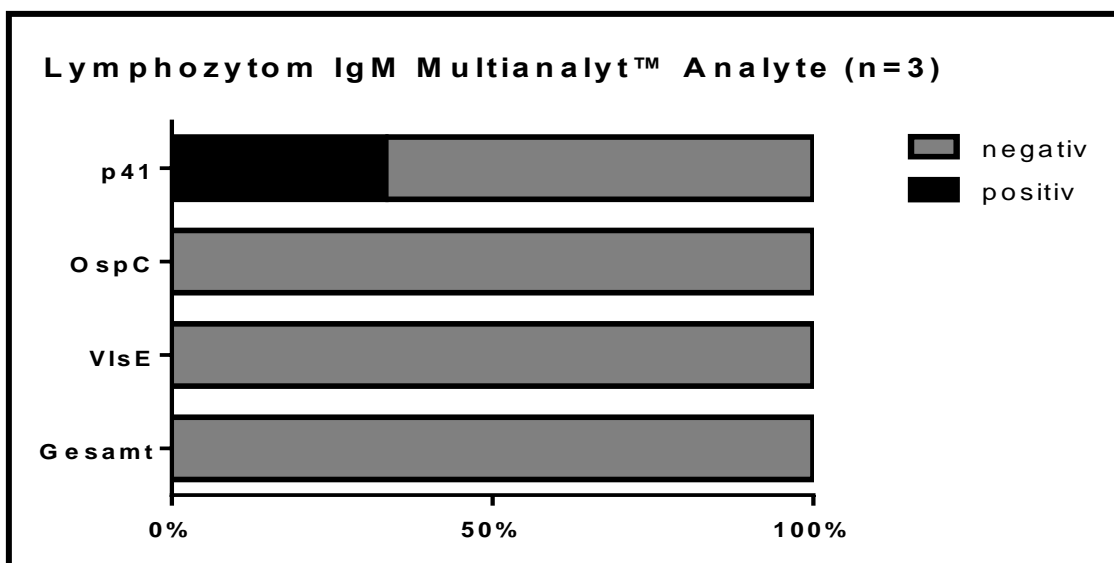


Abbildung 4.3.29-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der Lymphozytom-Seren

4.3.30 Lymphozytom: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der MEM-IgM-Seren eine Rate von 66,6 % (2) übereinstimmenden und 33,3 % (1) unterschiedlichen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 100 % (3) übereinstimmende Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 66,6 % (2). Bei 33,3 % (1) war das Ergebnis unterschiedlich.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 33,3 % (1) übereinstimmenden und 66,6 % (2) unterschiedlichen Ergebnissen.

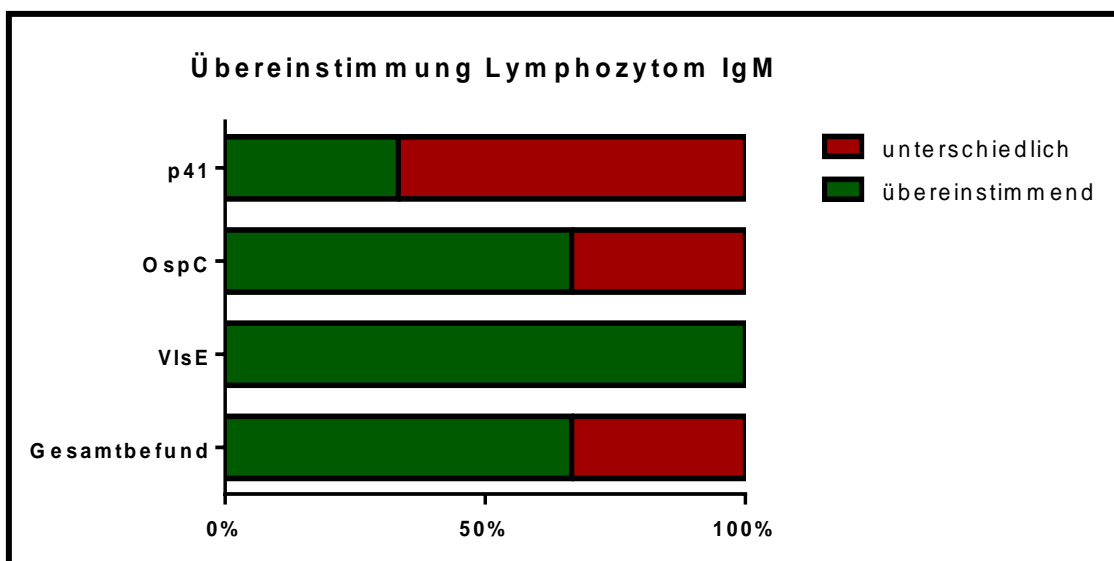


Abbildung 4.3.30-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der Lymphozytom-Seren

4.3.31 Spätinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 100 % (35) der Spätinfektionsseren positiv. Die **IgG-VlsE**-Bande war in 100% (35) der Fälle positiv. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 37,1 % (13) positiv und bei 62,9 % (22) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 57,1 % (20) positiv und bei 42,9 % (15) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 51,4 % (18) der Spätinfektionsfälle positiv und bei 48,6 % (17) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 28,6 % (10) der Proben positiv und bei 71,4 % (25) negativ.

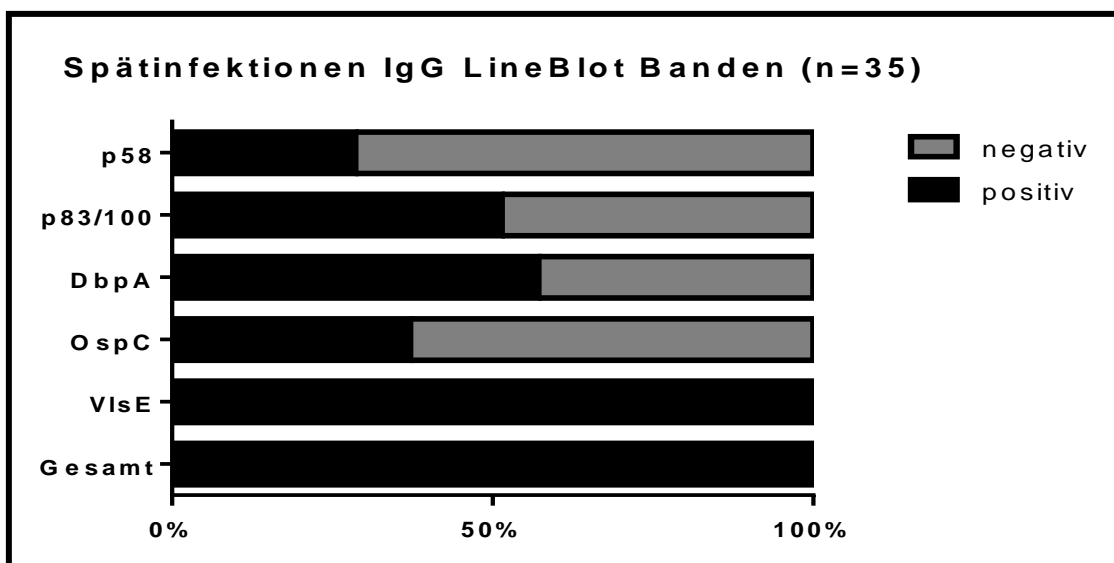


Abbildung 4.3.31-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der Spätinfektionsseren

4.3.32 Spätinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 85,7 % (30) der Spätinfektionsseren positiv, 11,4 % (4) grenzwertig und 2,9 % (1) negativ. Der **IgG-VisE**-Analyt war in 94,3 % (33) der Fälle positiv und in 5,7 % (2) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 14,3 % (5) positiv, bei 5,7 % (2) grenzwertig und bei 80 % (28) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 62,9 % (22) positiv, bei 2,9 % (1) grenzwertig und bei 34,3 % (12) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 22,9 % (8) der Spätinfektionsfälle positiv, bei 8,6 % (3) grenzwertig und bei 68,6 % (24) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 20 % (7) der Proben positiv, bei 5,7 % (2) grenzwertig und bei 74,3 % (26) negativ.

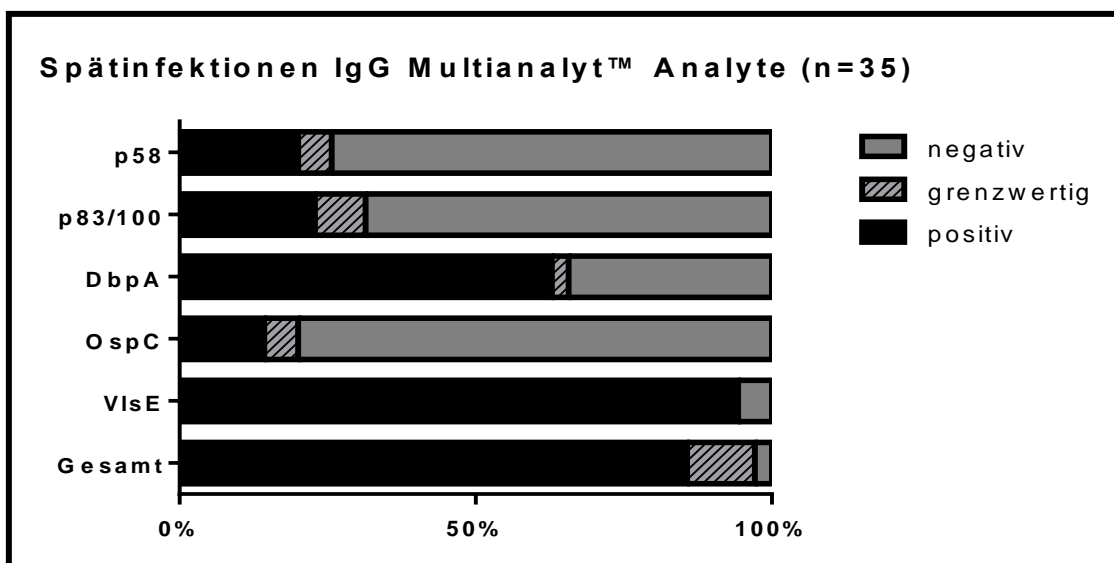


Abbildung 4.3.32-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der Spätinfektionsseren

4.3.33 Spätinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Spätstadien-IgG-Seren eine Rate von 85,7 % (30) übereinstimmenden, 2,9 % (1) unterschiedlichen und 11,4 % (4) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 94,3 % (33) übereinstimmenden und 5,7 % (2) unterschiedlichen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 57,1 % (20) übereinstimmende, 37,1 % (13) unterschiedliche und 5,7 % (2) grenzwertige Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 37,1 % (13) übereinstimmende, 60 % (21) unterschiedliche und 2,9 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 74,3 % (26) übereinstimmenden, 14,3 % (5) unterschiedlichen und 11,4 % (4) grenzwertigen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 82,9 % (29). Bei 11,4 % (4) gab es keine Übereinstimmung und 5,7 % (2) bildeten

Ergebnisse

grenzwertige Ergebnisse.

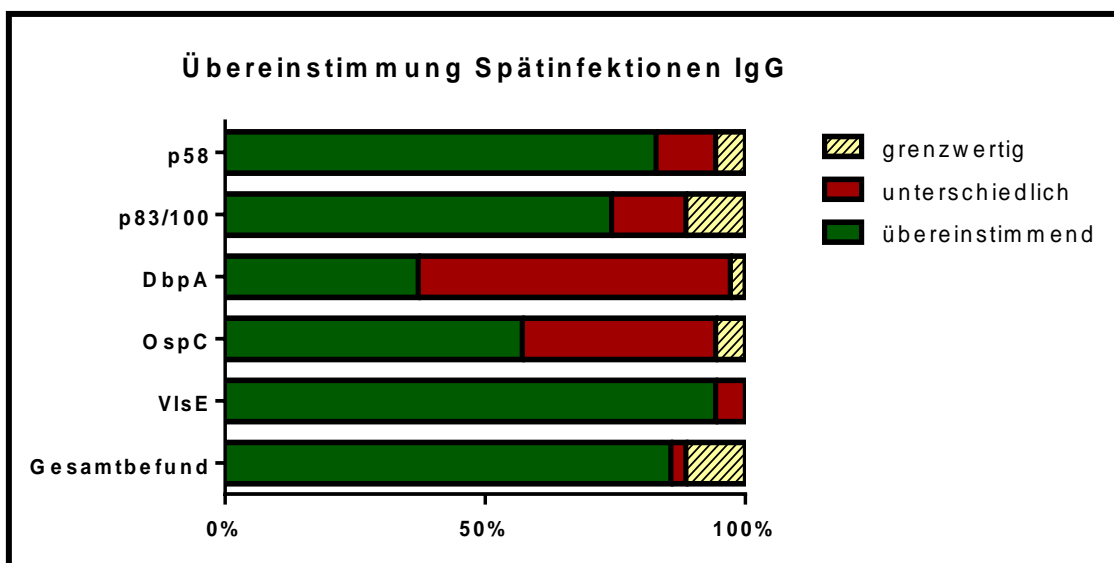


Abbildung 4.3.33-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Spätinfektionsseren

4.3.34 Spätinfektionen: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 54,3 % (19) der Spätinfektionenfälle positiv und 45,7 % (16) negativ. Die **IgM-VisE**-Bande war bei 8,6 % (3) der Fälle positiv und bei 91,4 % (32) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war bei 48,6 % (17) der Fälle positiv und bei 51,4 % (18) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 57,1 % (20) der untersuchten Spätinfektionsseren positiv und bei 42,9 % (15) negativ.

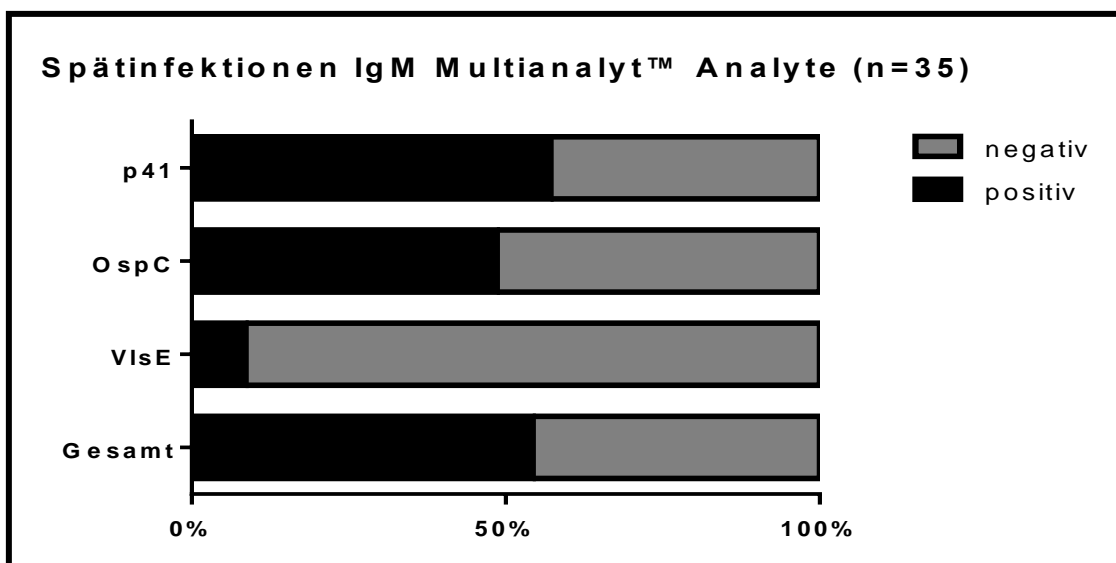


Abbildung 4.3.34-1: IgG-Immuno blot-Ergebnisse der Spätinfektionsseren

4.3.35 Spätinfektionen: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 37,1 % (13) der Spätinfektionsfälle positiv, 2,9 % (1) grenzwertig und 60 % (21) negativ. Der **IgM-VlsE**-Analyt war bei 4,9 % (2) positiv, bei 2,4 % (1) grenzwertig und bei 92,7 % (32) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war bei 40 % (14) positiv, bei 2,9 % (1) grenzwertig und bei 57,1 % (20) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 2,9 % (1) der Spätinfektionsseren grenzwertig und bei 97,1 % (34) negativ.

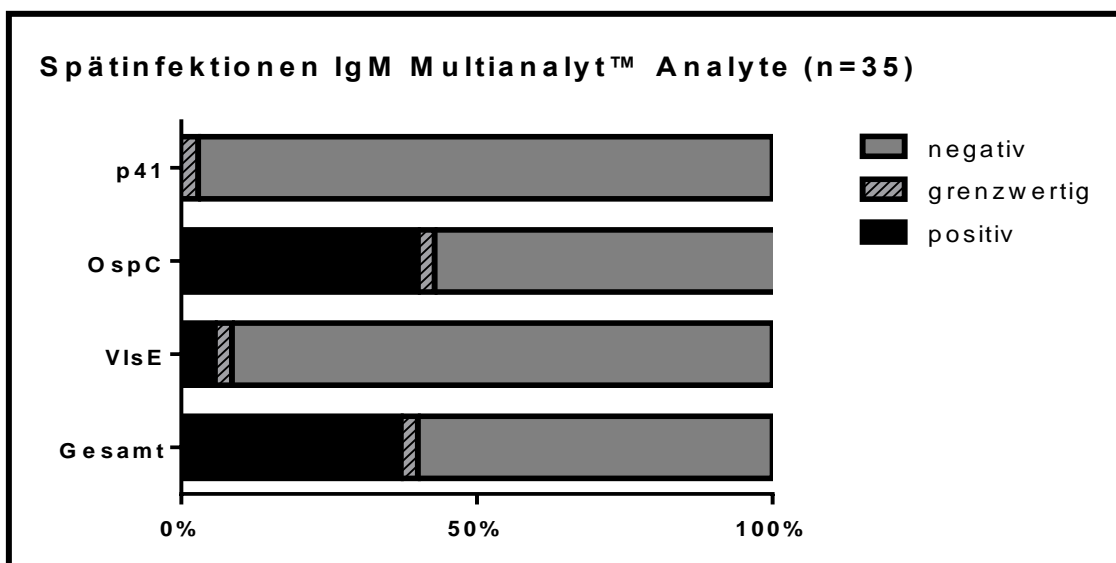


Abbildung 4.3.35-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der Spätinfektionsseren

4.3.36 Spätinfektionen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Spätinfektionsseren bei **IgM-Seren** eine Rate von 82,9 % (29) übereinstimmenden, 14,3 % (5) unterschiedlichen und 2,9 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 82,9 % (29) übereinstimmende, 14,3 % (5) unterschiedliche und 2,9 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 85,7 % (30). Bei 11,4 % (4) gab es keine Übereinstimmung und 2,9 % (1) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 37,1 % (13) übereinstimmenden, 60 % (21) unterschiedlichen und 2,9 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

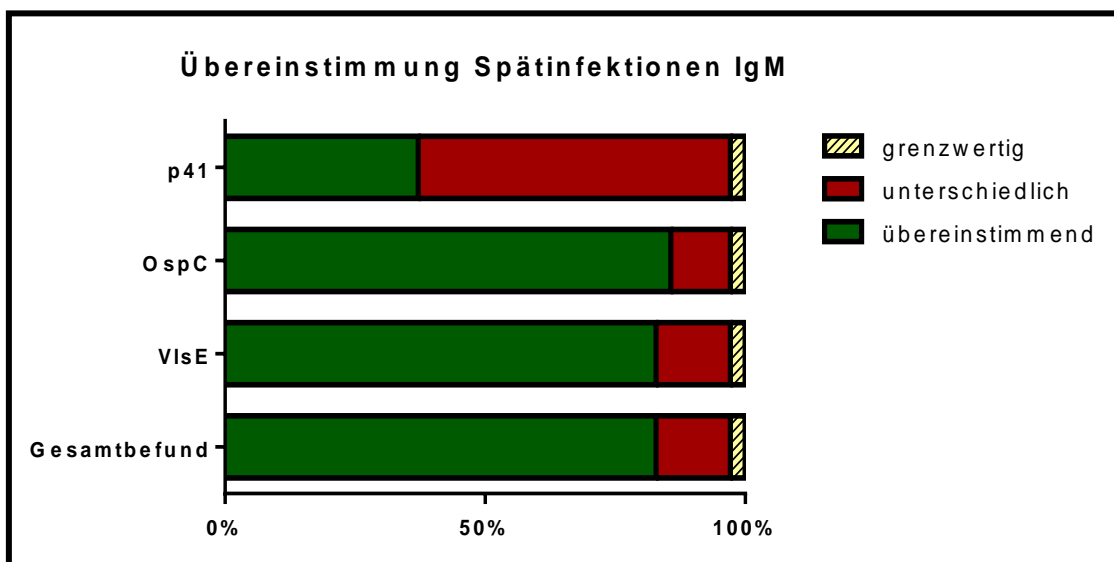


Abbildung 4.3.36-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der Spätinfektionsseren

4.3.37 Neuroborreliose: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 100 % (1) der Neuroborrelioseseren positiv. Die **IgG-VisE**-Bande war in 100 % (1) der Fälle positiv. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 100 % (1) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 100 % (1) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 100 % (1) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 100 % (1) der Proben negativ.

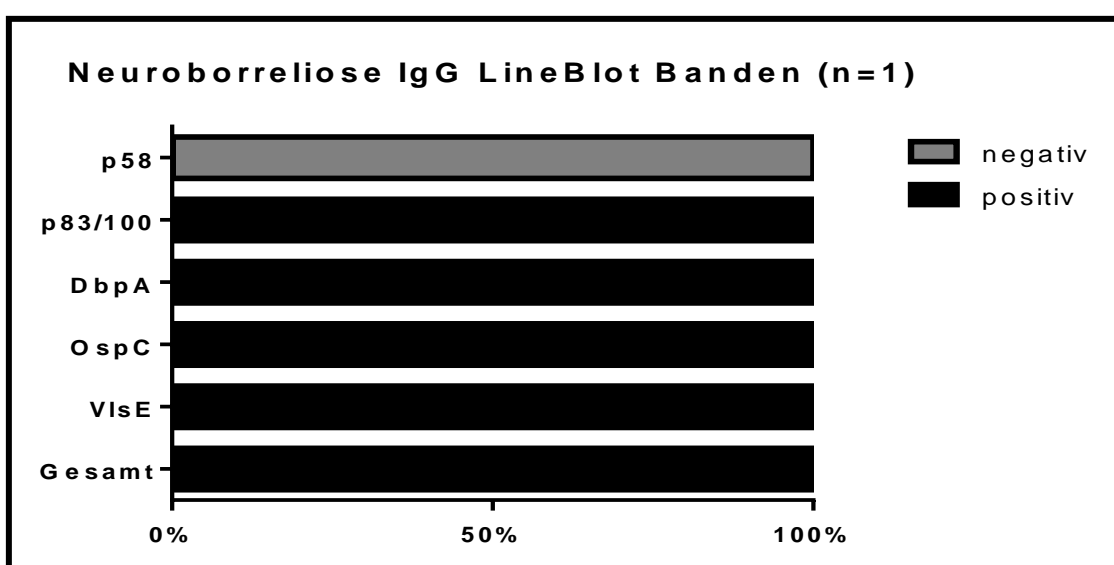


Abbildung 4.3.37-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der Neuroborrelioseseren

4.3.38 Neuroborreliose: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 100 % (1) der Neuroborrelioseseren positiv. Der **IgG-VisE**-Analyt war in 100 % (1) der Fälle positiv. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 100 % (1) positiv. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 100 % (1) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 100 % (1) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 100 % (1) negativ.

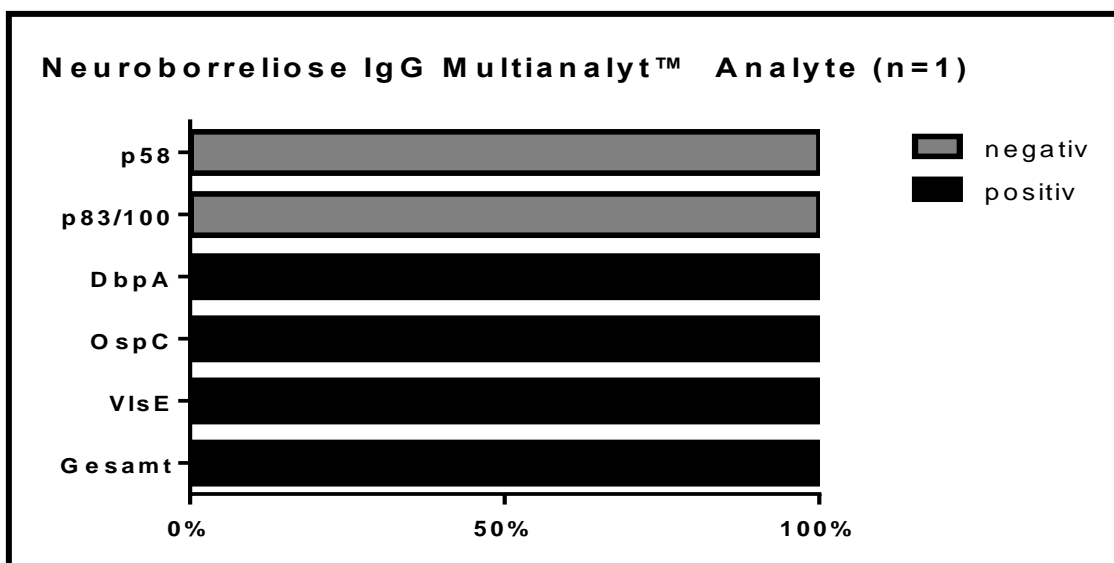


Abbildung 4.3.38-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der Neuroborrelioseseren

4.3.39 Neuroborreliose: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Neuroborreliose-**IgG-Seren** eine Rate von 100 % (1) übereinstimmenden Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 100 % (1) übereinstimmendem Ergebnis.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** ergab sich ein zu 100 % (1) unterschiedliches Ergebnis.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** ergab sich ein zu 100 % (1) übereinstimmendes Ergebnis.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 100 % (1) übereinstimmenden Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 100 % (1).

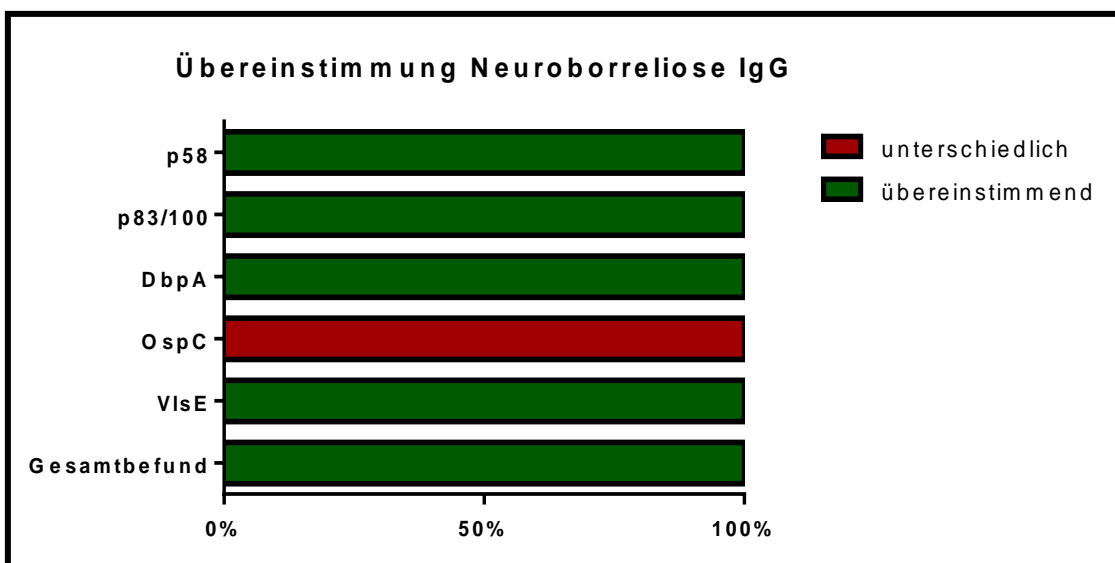


Abbildung 4.3.39-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Neuroborrelioseseren

4.3.40 Neuroborreliose: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 100 % (1) der Neuroborreliosefälle positiv. Die **IgM-VlsE**-Bande war bei 100 % (1) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war bei 100 % (1) der Fälle positiv. Im LineBlot war **IgM p41** bei 100 % (1) der Neuroborrelioseseren positiv.

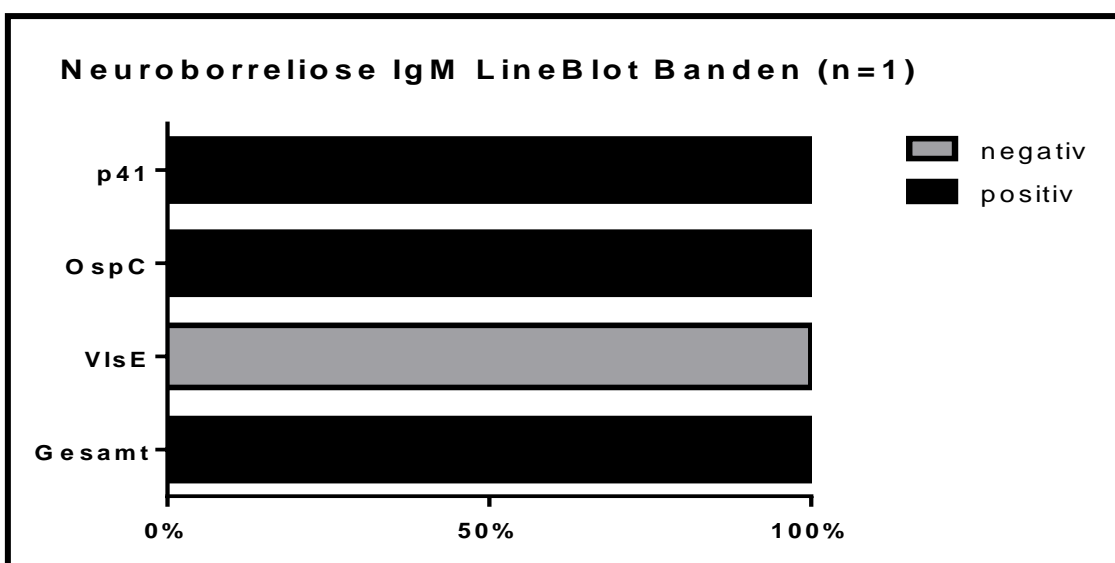


Abbildung 4.3.40-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der Neuroborrelioseseren

4.3.41 Neuroborreliose: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 100 % (1) der Neuroborreliosefälle negativ. Der **IgM-VisE**-Analyt war bei 100 % (1) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war bei 100 % (1) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 100 % (1) der Neuroborrelioseseren negativ.

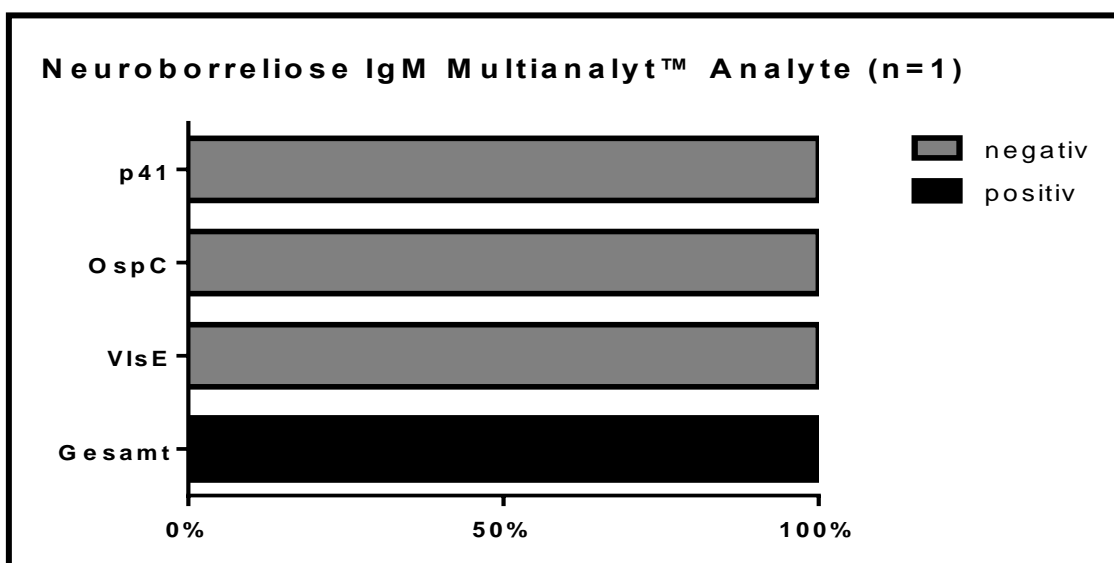


Abbildung 4.3.41-1: IgM-Immunoassay-Ergebnisse der Neuroborrelioseseren

4.3.42 Neuroborreliose: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Neuroborreliose-**IgM-Seren** eine Rate von 100 % (1) unterschiedlichen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** ergab sich ein zu 100 % (1) übereinstimmendes Ergebnis.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 0 % (1). Die getesteten Methoden ergaben unterschiedliche Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 100 % (1) unterschiedlichen Ergebnissen.

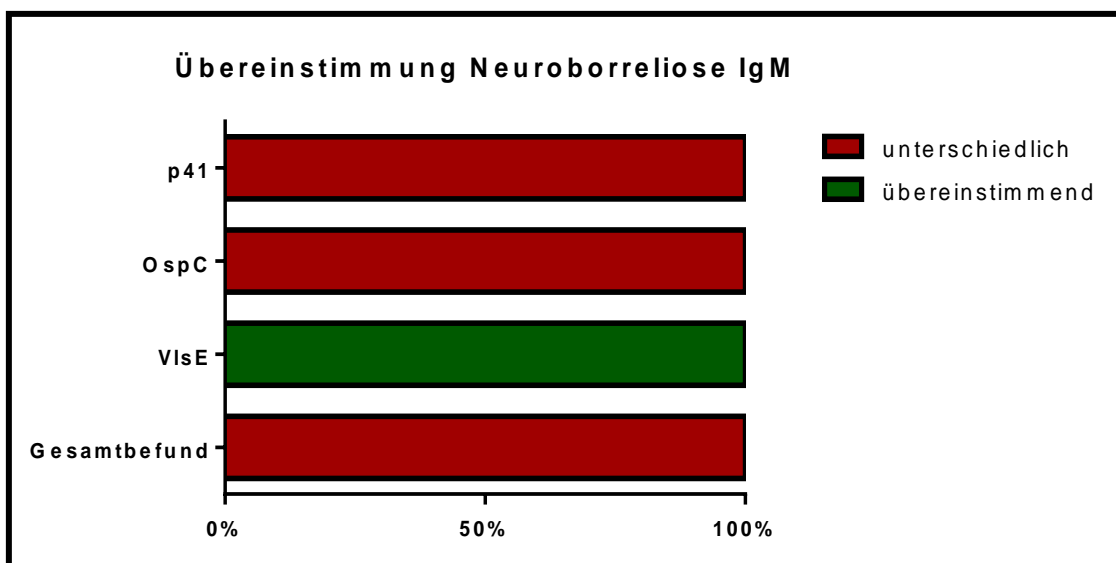


Abbildung 4.3.42-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Neuroborrelioseseren

4.3.43 ACA: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 100 % (15) der ACA-Seren positiv. Die **IgG-VlsE**-Bande war in 100 % (15) der Fälle positiv. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 26,7 % (4) positiv und bei 73,3 % (11) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande bei 53,3 % (8) positiv und bei 46,7 % (7) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 53,3 % (8) positiv und bei 46,7 % (7) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 33,3 % (5) der Proben positiv und bei 66,7 % (10) negativ.

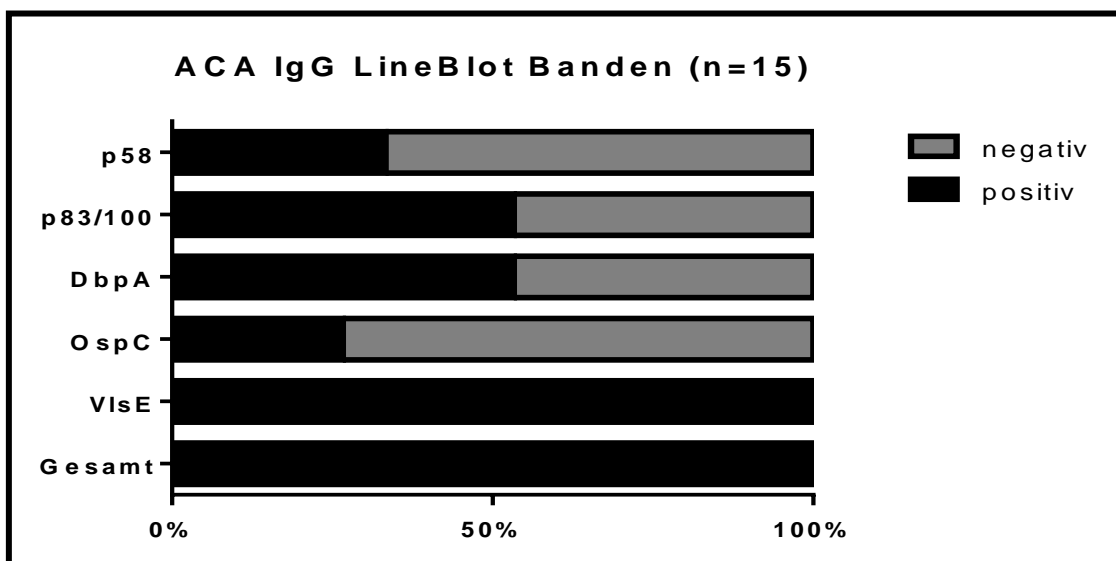


Abbildung 4.3.43-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der ACA-Seren

4.3.44 ACA: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 100 % (15) der ACA-Seren positiv. Der **IgG-VlsE-Analyt** war in 100 % (15) der Fälle positiv. Der **IgG-OspC-Analyt** war bei 20 % (3) positiv, bei 13,3 % (2) grenzwertig und bei 66,7 % (10) negativ. Der **IgG-DbpA-Analyt** war bei 86,7 % (13) positiv und bei 13,3 % (2) negativ. Der **IgG-p83/100-Analyt** war bei 26,7 % (4) positiv, bei 13,3 % (2) grenzwertig und bei 60 % (9) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 26,7 % (4) positiv, bei 13,3 % (2) grenzwertig und bei 60 % (9) negativ.

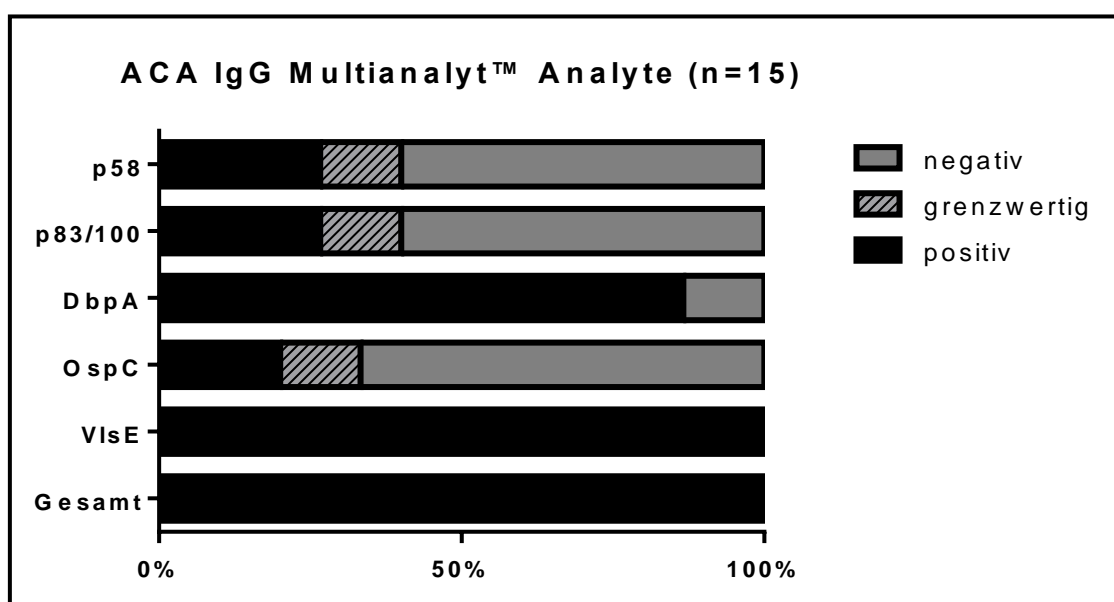


Abbildung 4.3.44-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der ACA-Seren

4.3.45 ACA: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der ACA-IgG-Seren eine Rate von 100 % (15) übereinstimmenden Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 100 % (15) übereinstimmenden Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 53,3 % (8) übereinstimmende, 33,3 % (5) unterschiedliche und 13,3 % (2) grenzwertige Ergebnisse.

Ergebnisse

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 53,3 % (8) übereinstimmende und 46,7 % (7) unterschiedliche Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 73,3 % (11) übereinstimmenden, 13,3 % (2) unterschiedlichen und 13,3 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 73,3 % (11). Bei 13,3 % (2) sowie bei weiteren 13,3 % (2) ergaben sich unterschiedliche und grenzwertige Ergebnisse.

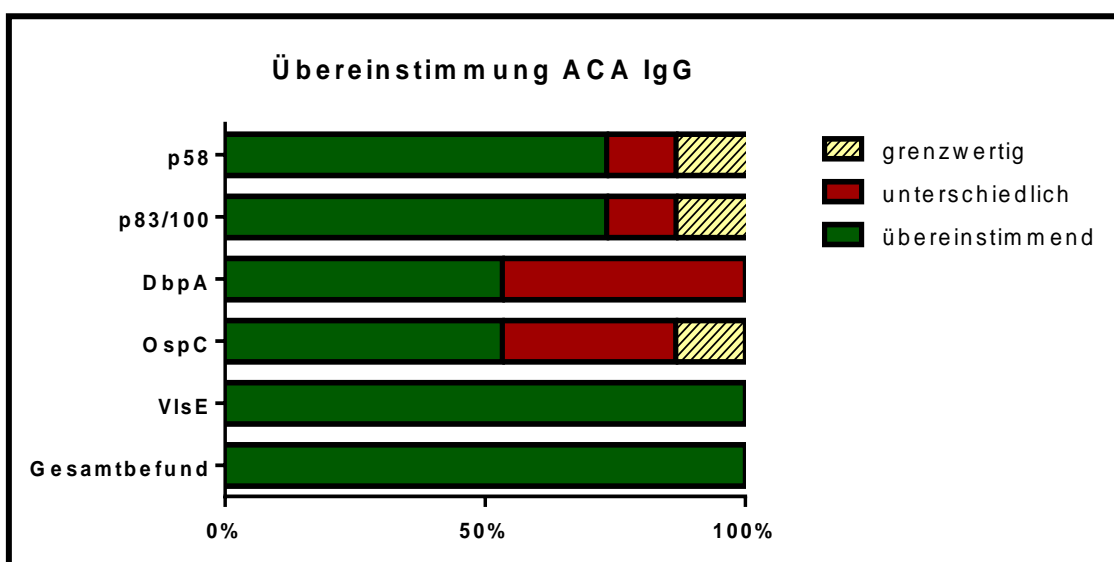


Abbildung 4.3.45-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der ACA-Seren

4.3.46 ACA: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 33,7 % (5) der ACA-Fälle positiv und 66,7 % (10) negativ. Die **IgM-VlsE**-Bande war bei 6,7 % (1) positiv und bei 93,3 % (14) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war bei 33,3 % (5) der Fälle positiv und bei 66,7 % (10) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 46,7 % (7) der ACA-Seren positiv und bei 53,3 % (8) negativ.

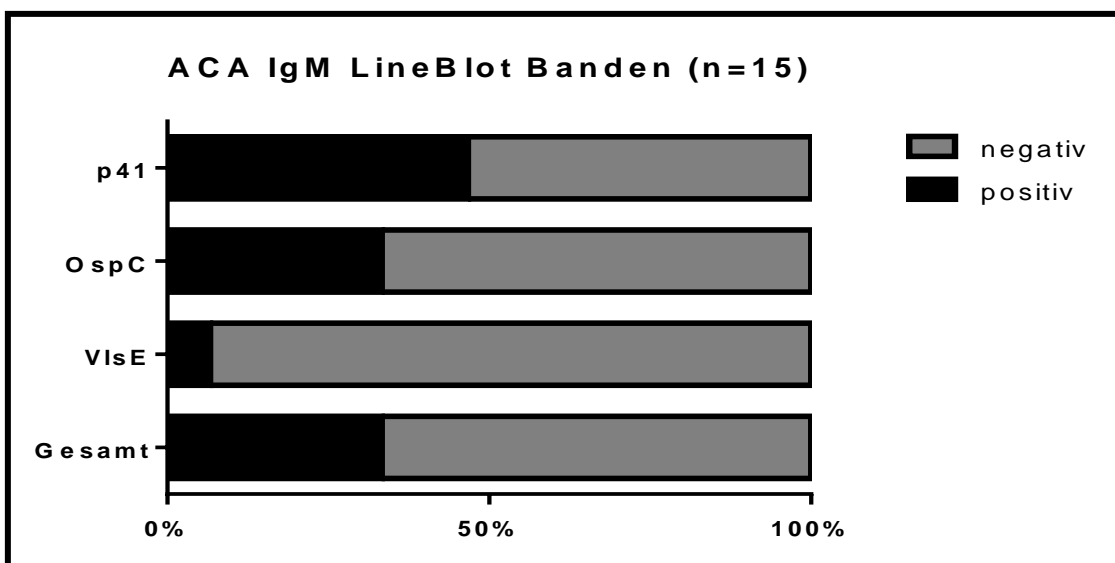


Abbildung 4.3.46-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der ACA-Seren

4.3.47 ACA: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 33,3 % (5) der ACA-Fälle positiv und 66,7 % (10) negativ. Der **IgM-VisE**-Analyt war bei 6,7 % (1) grenzwertig und bei 93,3 % (14) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war bei 33,3 % (5) positiv und bei 66,7 % (10) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 6,7 % (1) der ACA-Seren grenzwertig und bei 93,3 % (14) negativ.

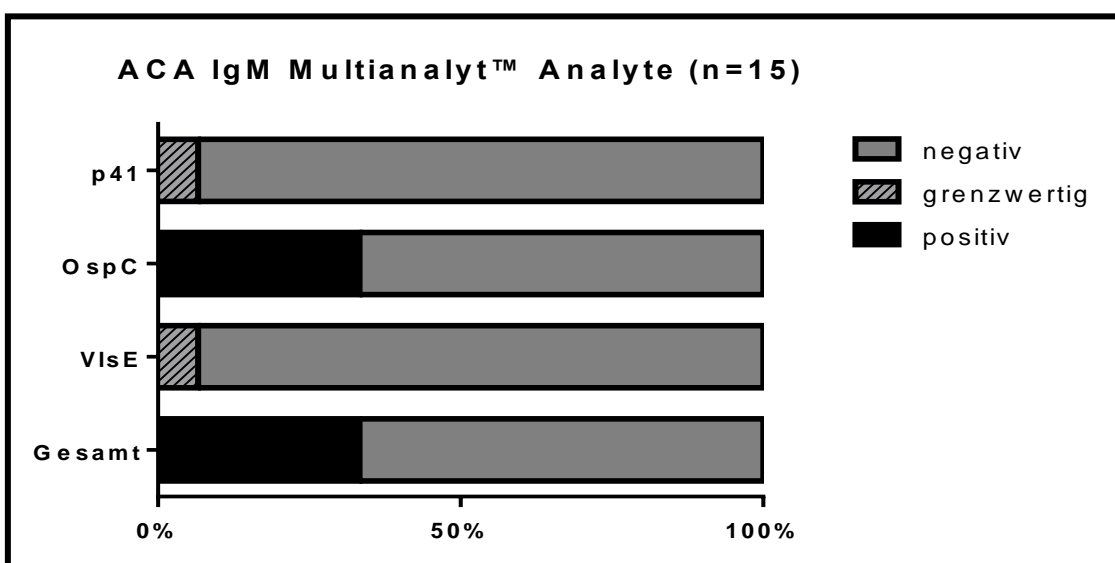


Abbildung 4.3.47-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse der ACA-Seren

4.3.48 ACA: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Neuroborreliose-IgM-Seren eine Rate von 100 % (15) unterschiedlichen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 86,7 % (13) übereinstimmende Ergebnisse. Bei 6,7 % (1) gab es ein unterschiedliches und bei 6,7 % (1) ein grenzwertiges Ergebnis.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 86,7 % (13). Bei 13,3 % (2) stellte sich ein unterschiedliches Ergebnis dar.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 40 % (6) übereinstimmenden, 53,3 % (8) unterschiedlichen und 6,7 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

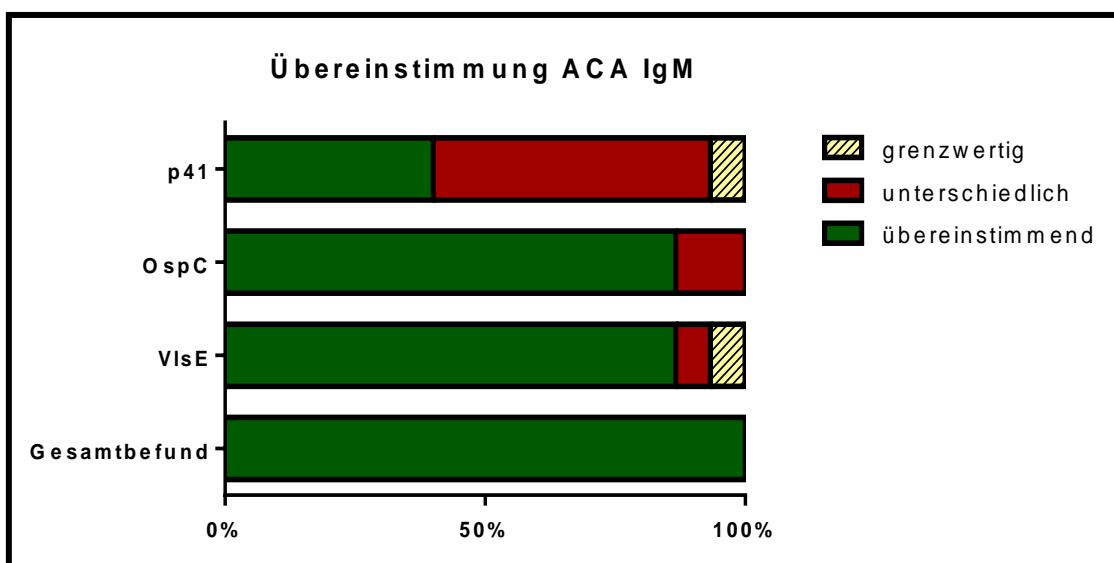


Abbildung 4.3.48-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der ACA-Seren

4.3.49 Lyme-Arthritis: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 100 % (19) der Lyme-Arthritis-Seren positiv. Die **IgG-VisE-Bande** war in 100 % (19) der Fälle positiv. Die **IgG-OspC-Bande** war bei

Ergebnisse

32,1 % (8) positiv und bei 57,9 % (11) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 57,9 % (11) positiv und bei 32,1 % (8) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande war bei 47,4 % (9) positiv und bei 52,6 % (10) negativ. **IgG p58** war im Immunoblot bei 26,3 % (5) der Proben positiv und bei 73,7 % (14) negativ.

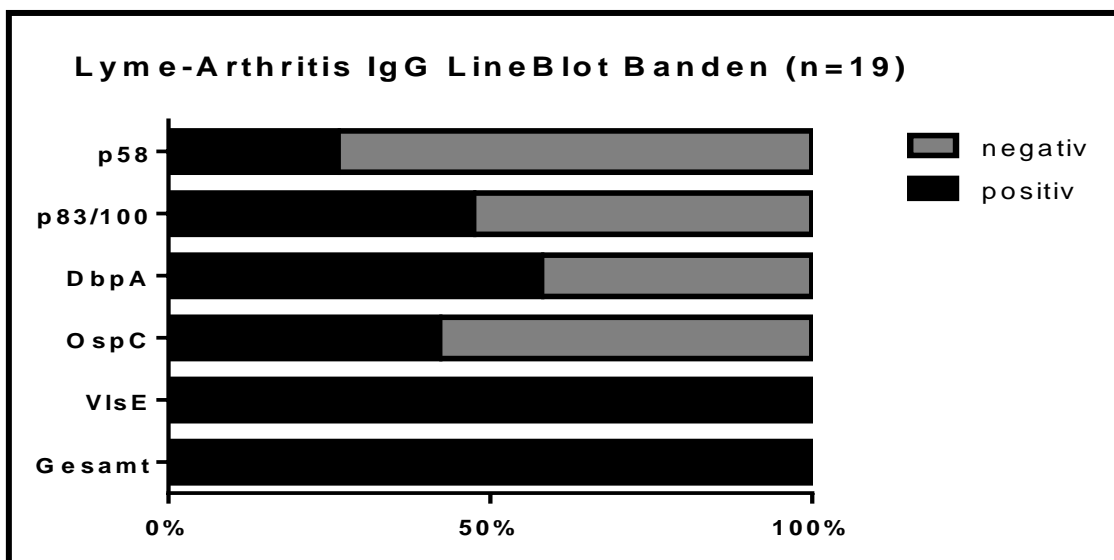


Abbildung 4.3.49-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.50 Lyme-Arthritis: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 73,7 % (14) der Lyme-Arthritis-Seren positiv, 21,1 % (4) grenzwertig und 5,3 % (1) negativ. Der **IgG-VlsE**-Analyt war in 89,5 % (17) der Fälle positiv und in 10,5 % (2) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 5,3 % (1) positiv und bei 94,7 % (18) der Fälle negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 42,1 % (8) positiv, bei 5,3 % (1) grenzwertig und bei 52,6 % (10) der Fälle negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 21,1 % (4) der Fälle positiv, bei 5,3 % (1) grenzwertig und bei 73,7 % (14) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 15,8 % (3) der Fälle positiv und bei 84,2 % (16) negativ.

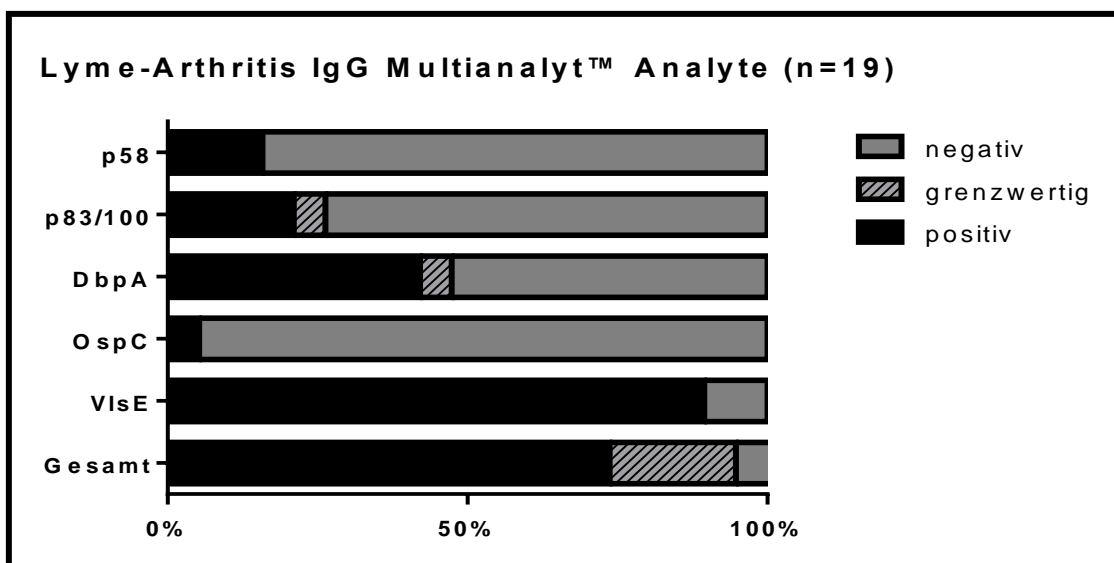


Abbildung 4.3.50-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.51 Lyme-Arthritis: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Lyme-Arthritis-**IgG-Seren** eine Rate von 73,7 % (14) übereinstimmenden, 5,3 % (1) unterschiedlichen und 21 % (4) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 89,5 % (17) übereinstimmenden und 10,5 % (2) unterschiedlichen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 63,2 % (12) übereinstimmende und 36,8 % (7) unterschiedliche Ergebnisse.

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 21 % (4) übereinstimmende, 73,7 % (14) unterschiedliche und 5,3 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 73,7 % (14) übereinstimmenden, 15,8 % (3) unterschiedlichen und 10,5 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz

Ergebnisse

von 89,5 % (17). Bei 10,5 % (2) gab es keine Übereinstimmung.

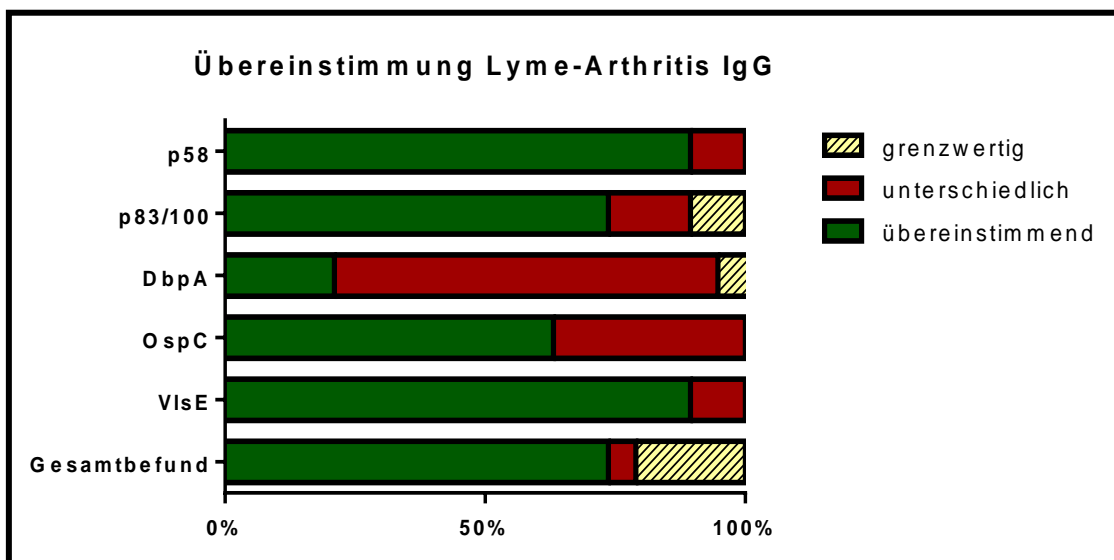


Abbildung 4.3.51-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.52 Lyme-Arthritis: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 68,4 % (13) der Lyme-Arthritis-Fälle positiv und 31,6 % (6) negativ. Die **IgM-VisE**-Bande war bei 10,5 % (2) positiv und bei 89,5 % (17) negativ. Die Bande für **IgM OspC** war bei 57,9 % (11) der Fälle positiv und bei 42,1 % (8) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 63,2 % (12) der Lyme-Arthritis-Seren positiv und bei 36,8 % (7) negativ.

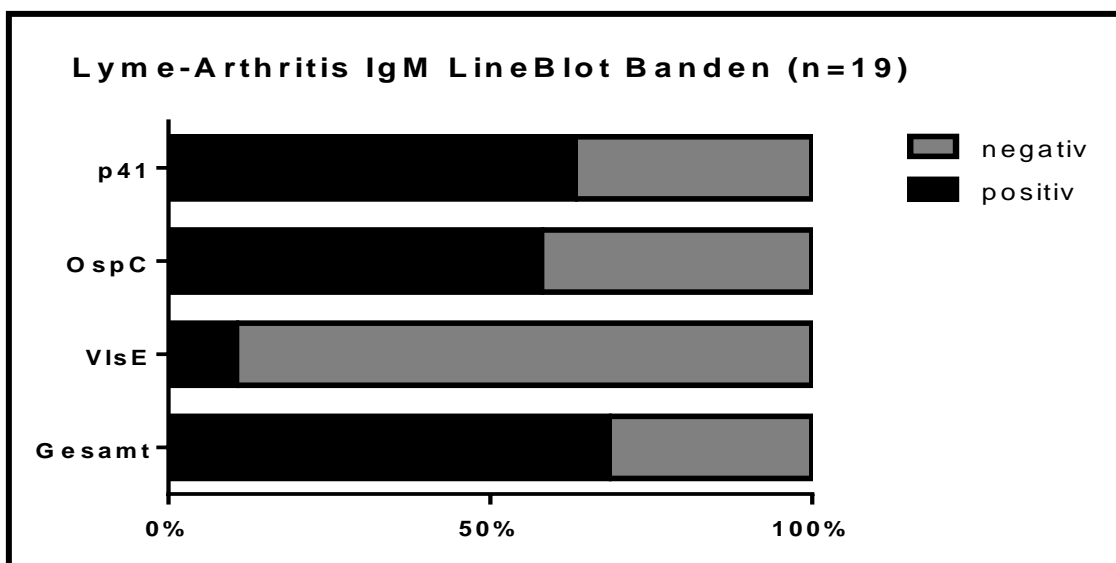


Abbildung 4.3.52-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.53 Lyme-Arthritis: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 42,1 % (8) der Lyme-Arthritis-Fälle positiv, 5,3 % (1) grenzwertig und 52,6 % (10) negativ. Der **IgM-VlsE**-Analyt war bei 10,5 % (2) positiv und bei 89,5 % (17) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war bei 47,6 % (9) positiv, 5,3 % (1) grenzwertig und 47,6 % (9) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 100 % (19) der Lyme-Arthritis-Seren negativ.

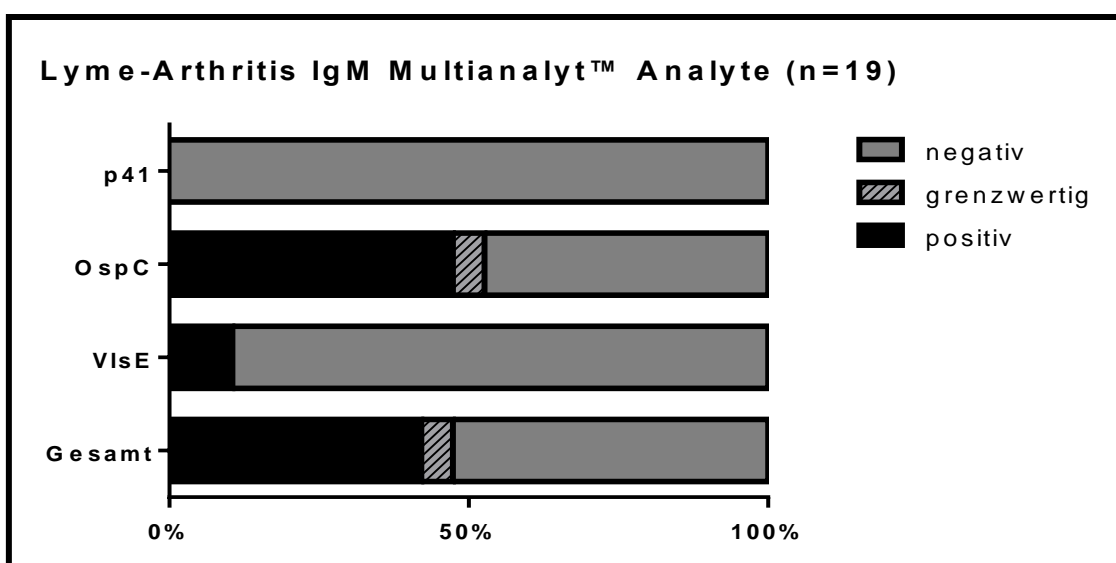


Abbildung 4.3.53-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.54 Lyme-Arthritis: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM-Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der Lyme-Arthritis-IgM-Seren eine Rate von 73,7 % (14) übereinstimmenden, 21 % (4) unterschiedlichen und 5,3 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VisE IgM** fanden sich 79 % (15) übereinstimmende und 21 % (4) unterschiedliche Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 89,4 % (17). Bei 5,3 % (1) gab es keine übereinstimmenden und bei 5,3 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 36,8 % (7) übereinstimmenden und 63,2 % (12) unterschiedlichen Ergebnissen.

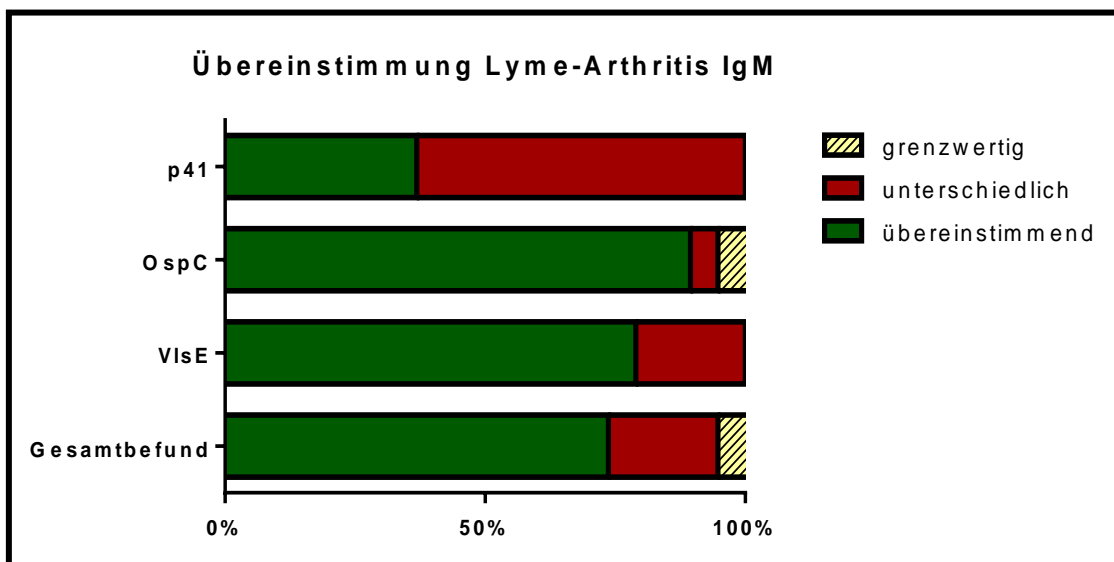


Abbildung 4.3.54-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der Lyme-Arthritis-Seren

4.3.55 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-LineBlot** waren 37 % (10) der atypischen, anderweitigen Diagnosen-Seren positiv 11,1 % (3) grenzwertig und 51,9 % (14) negativ. Die **IgG-VIsE**-Bande war in 44,4 % (12) der Fälle positiv und in 55,6 % (15) negativ. Die **IgG-OspC**-Bande war bei 22,2 % (6) positiv und bei 77,8 % (21) negativ. Die **IgG-DbpA**-Bande war bei 11,1 % (3) positiv und bei 88,9 % (24) negativ. Die **IgG-p83/100**-Bande wies bei 14,8 % (4) der Proben ein positives und bei 85,2 % (23) ein negatives Ergebnis auf. **IgG p58** war im Immunoblot bei 14,8 % (4) der Proben positiv und bei 85,2 % (23) negativ.

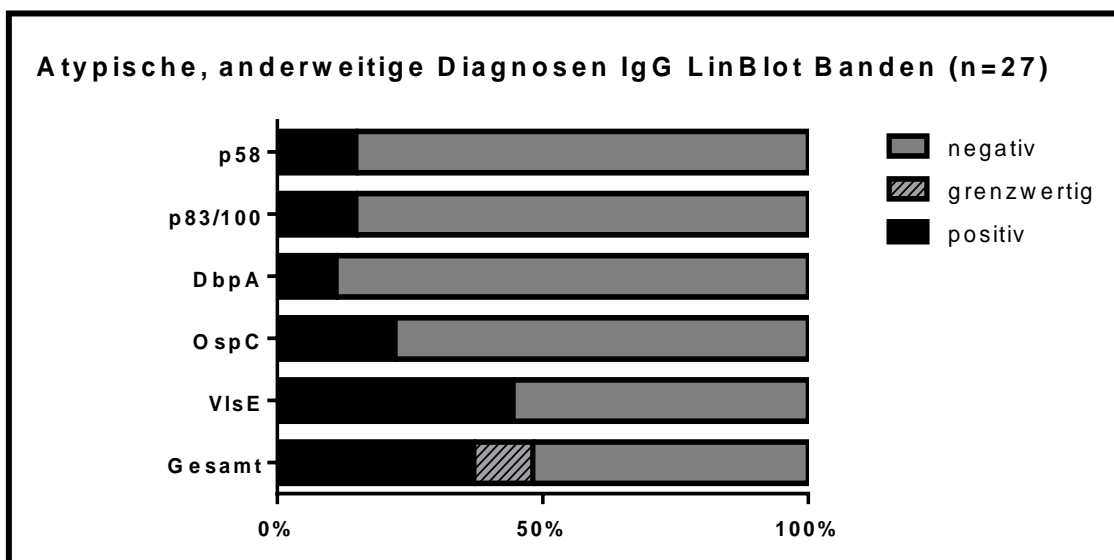


Abbildung 4.3.55-1: IgG-Immunoblot-Ergebnisse der atypischen, anderweitigen Diagnosen

4.3.56 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgG und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgG-Multianalyt™** waren 33,3 % (9) der atypischen, anderweitigen Diagnosen-Seren positiv, 11,1 % (3) grenzwertig und 55,6 % (15) negativ. Der **IgG-VIsE**-Analyt war in 40,7 % (11) der Fälle positiv, in 3,7 % (1) grenzwertig und in 55,6 % (15) negativ. Der **IgG-OspC**-Analyt war bei 18,5 % (5) positiv, bei 3,7 % (1)

Ergebnisse

grenzwertig und bei 77,8 % (21) negativ. Der **IgG-DbpA**-Analyt war bei 25,9 % (7) positiv und bei 74,1 % (20) negativ. Der **IgG-p83/100**-Analyt war bei 7,4 % (2) der atypischen, anderweitigen Diagnosen positiv, bei 7,4 % (2) grenzwertig und bei 85,2 % (23) negativ. **IgG p58** war im Multianalyt™ bei 3,7 % (1) der Proben positiv, bei 3,7 % (1) grenzwertig und bei 92,6 % (25) negativ.

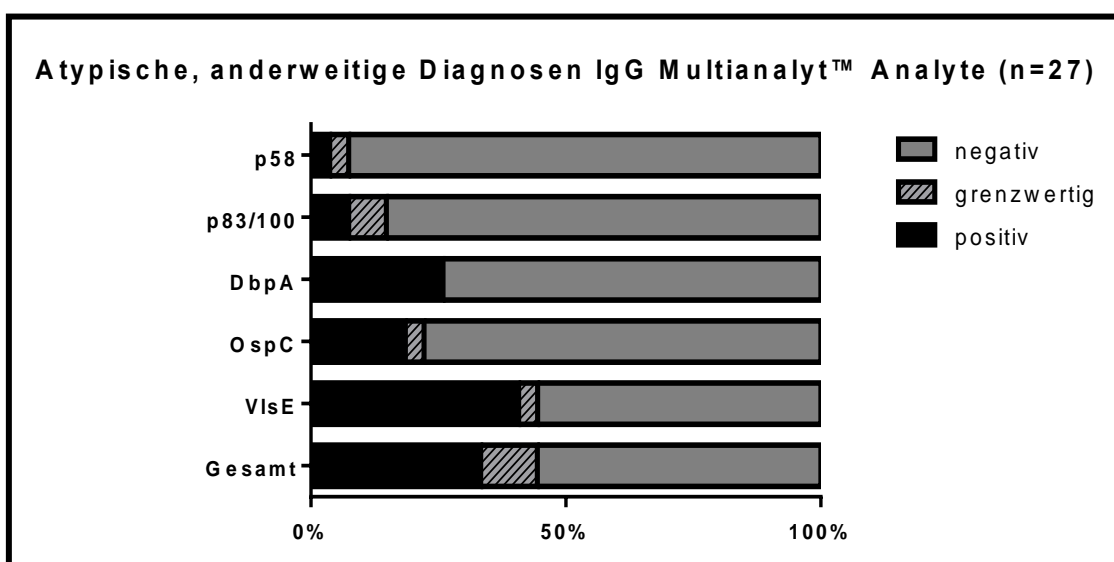


Abbildung 4.3.56-1: IgG-Multianalyt-Ergebnisse der atypischen, anderweitigen Diagnosen

4.3.57 Atypische, anderweitige Diagnosen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgG- Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der atypischen, anderweitigen Diagnosen-IgG-Seren eine Rate von 81,5 % (22) übereinstimmenden, 11,1 % (3) unterschiedlichen und 7,4 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **VlsE IgG** eine Rate von 92,6 % (25) übereinstimmenden, 3,7 % (1) unterschiedlichen und 3,7 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **OspC IgG** fanden sich 85,2 % (23) übereinstimmende, 11,1 % (3) unterschiedliche und 3,7 % (1) grenzwertige Ergebnisse.

Ergebnisse

Im direkten Vergleich für **DbpA IgG** fanden sich 85,2 % (23) übereinstimmende und 14,8 % (4) unterschiedliche Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p83/100 IgG** eine Rate von 85,2 % (23) übereinstimmenden, 7,8 % (2) unterschiedlichen und 7,8 % (2) grenzwertigen Ergebnissen.

Für das Antigen **p58 IgG** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 81,5 % (22). Bei 14,8 % (4) gab es keine Übereinstimmung und 3,7 % (1) bildeten grenzwertige Ergebnisse.

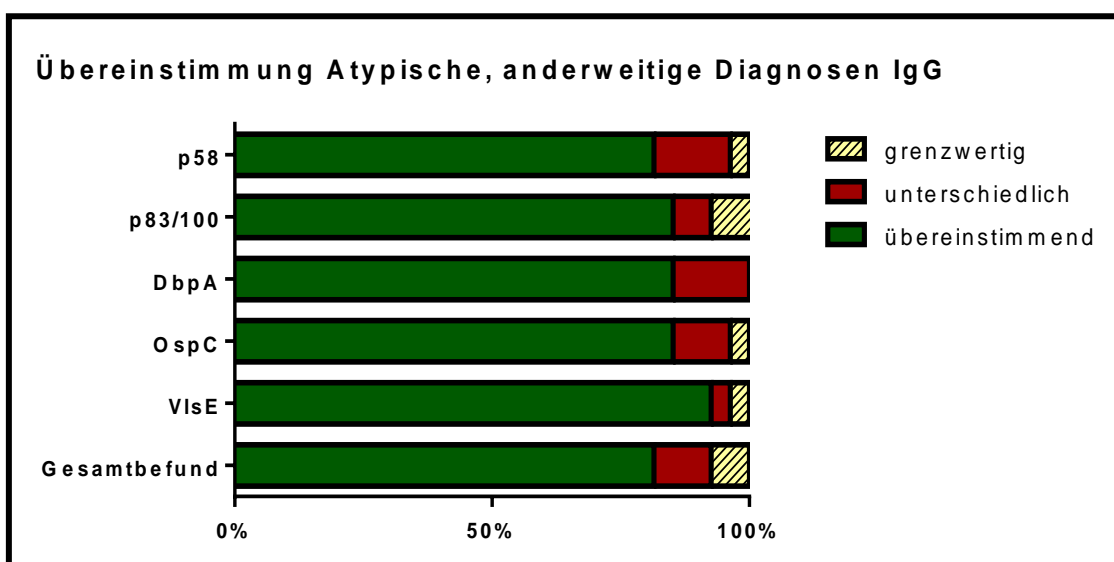


Abbildung 4.3.57-1: Übereinstimmung der beiden IgG-Testmethoden der atypischen, anderweitigen Diagnose-Seren

4.3.58 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von LineBlot-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-LineBlot** waren 59,3 % (16) der atypischen, anderweitigen Diagnosen-Fälle positiv und 40,7 % (11) negativ. Die **IgM-VisE**-Bande war bei 100 % (27) positiv. Die Bande für **IgM OspC** war bei 44,4 % (12) positiv und bei 55,6 % (15) negativ. Im LineBlot war **IgM p41** bei 66,7 % (18) der Verdachtsdiagnosen-Seren positiv und bei 33,3 % (9) negativ.

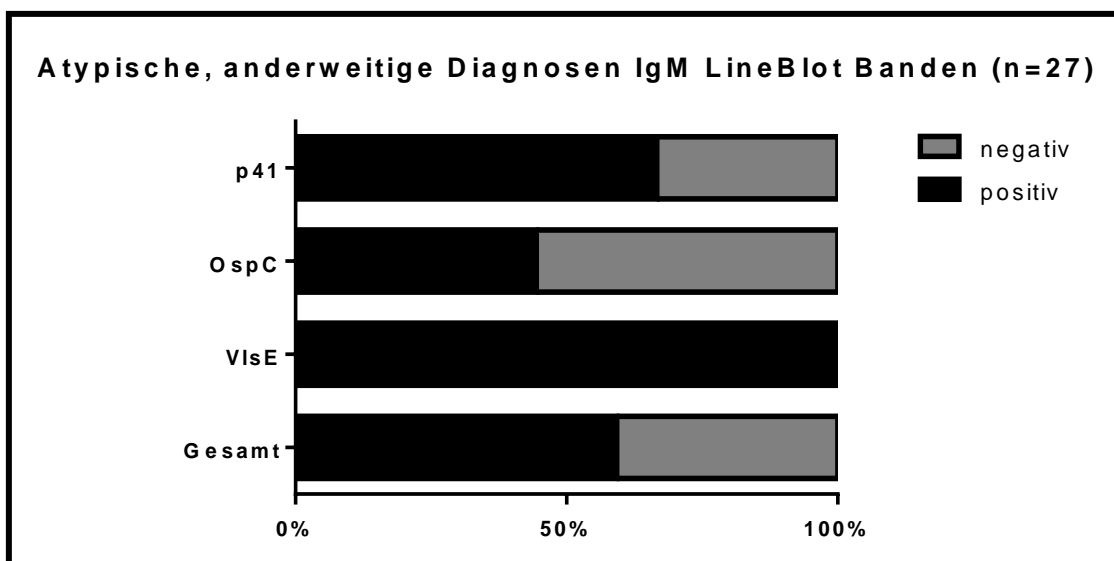


Abbildung 4.3.58-1: IgM-Immunoblot-Ergebnisse der atypischen, anderweitigen Diagnosen

4.3.59 Atypische, anderweitige Diagnosen zum Ausschluss: Serologie von Multianalyt™-Gesamt-IgM und dazugehörigen Antigenen

Im **Gesamtbefund** des **IgM-Multianalyt™** waren 29,6 % (8) der atypischen, anderweitigen Diagnosen positiv, 3,7 % (1) grenzwertig und 66,7 % (18) negativ. Der **IgM-VlsE**-Analyt war bei 11,1 % (3) grenzwertig und bei 88,9 % (24) negativ. Der Analyt für **IgM OspC** war 25,9 % (7) positiv, bei 7,4 % (2) grenzwertig und bei 66,7 % (18) negativ. Im Multianalyt™ war **IgM p41** bei 7,4 % (2) der atypischen, anderweitigen Diagnosen-Seren grenzwertig und bei 92,6 % (25) negativ.

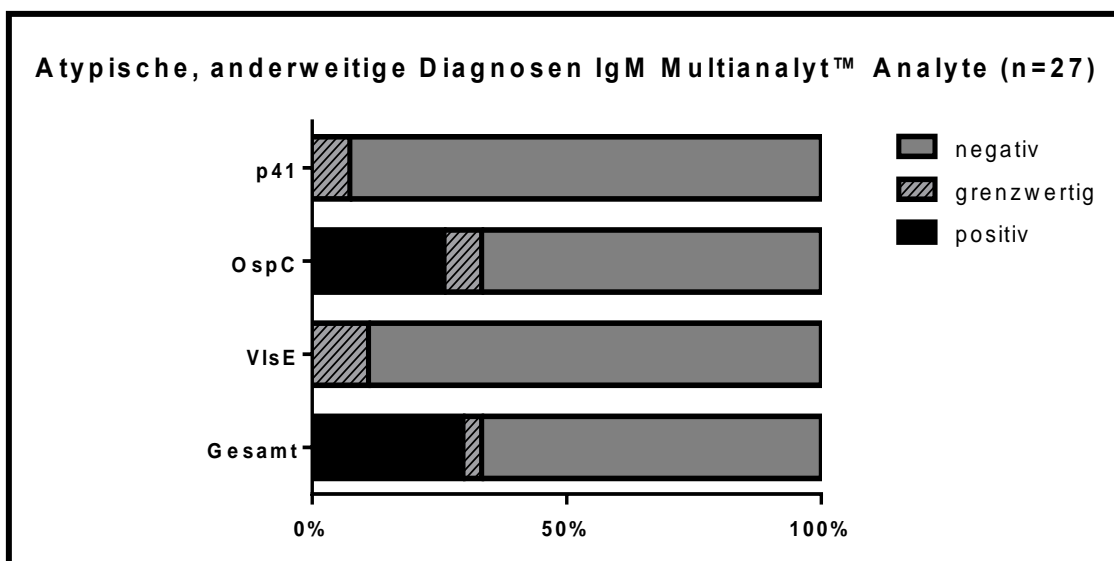


Abbildung 4.3.59-1: IgM-Multianalyt-Ergebnisse der atypischen, anderweitigen Diagnosen

4.3.60 Atypische, anderweitige Diagnosen: Übereinstimmung von Multianalyt™- und LineBlot-IgM- Ergebnissen

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab beim **Gesamtbefund** der atypischen, anderweitigen Diagnosen-IgM-Seren eine Rate von 63 % (17) übereinstimmenden, 33,3 % (9) unterschiedlichen und 3,7 % (1) grenzwertigen Ergebnissen.

Im direkten Vergleich für **VlsE IgM** fanden sich 88,8 % (24) übereinstimmende und 11,2 % (3) grenzwertige Ergebnisse.

Für das Antigen **OspC IgM** hatten die beiden getesteten Methoden eine Korrespondenz von 66,7 % (18). Bei 25,9 % (7) gab es keine übereinstimmenden und bei 7,4 % (2) grenzwertige Ergebnisse.

Die Korrespondenz der beiden Methoden ergab bezüglich des Antigens **p41 IgM** eine Rate von 33,3 % (9) übereinstimmenden, 7,4 % (2) grenzwertigen und 59,3 % (16) unterschiedlichen Ergebnissen.

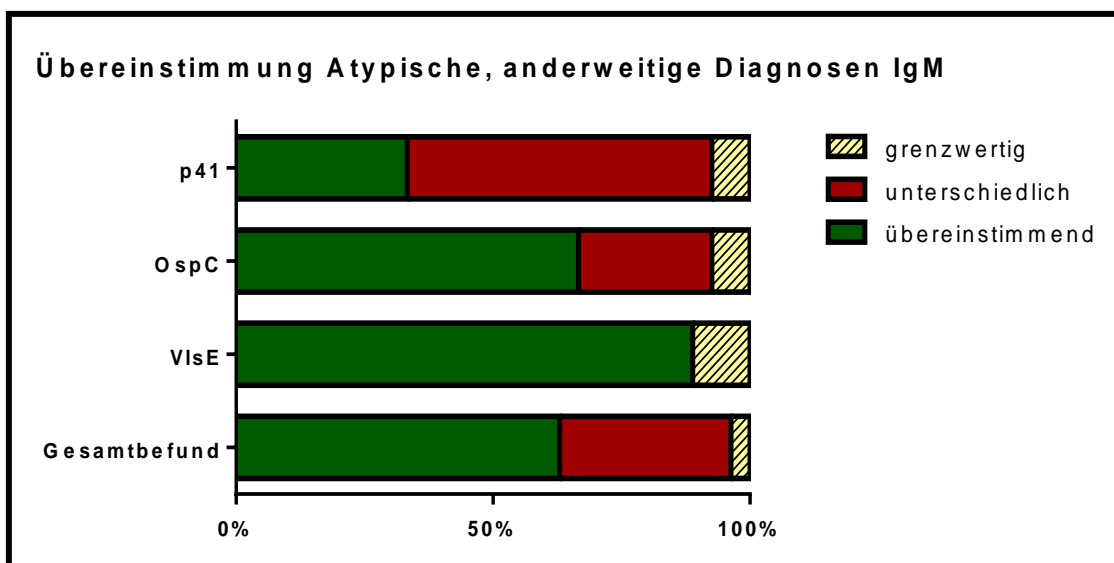


Abbildung 4.3.60-1: Übereinstimmung der beiden IgM-Testmethoden der atypischen, anderweitigen Diagnose-Seren

5 Diskussion

5.1 Kompletter Serensatz

5.1.1 IgG

Bei der Untersuchung aller Seren der IgG-Reihe lag die Übereinstimmung der beiden Methoden bezüglich des Gesamtbefundes bei 80,8 %. Die Übereinstimmung der positiven Ergebnisse beider Methoden war hierbei 90,5 %.

IgG Gesamt

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 63/78=80,8 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 19/21=90,5 %

Gesamt IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	62,3 % (63)	11,9 % (12)	3% (3)	77,2 % (78)
	grenzwertig	1 % (1)	0 % (0)	1% (1)	2 % (2)
	negativ	1 % (1)	1 % (1)	18,8% (19)	20,8 % (21)
gesamt		64,4 % (65)	12,9 % (13)	22,8 % (23)	100 % (101)

Die höchste prozentuelle Übereinstimmung erreichte der Multianalyt-B.-burgdorferi-IgG-Test beim Detektieren der Antikörper gegen VlsE. Beim kompletten Serensatz lag die Kongruenz mit der Standardmethode (LineBlot) bei positiven Proben bei 89,7 %.

Die nächsthöheren Übereinstimmungen wurden bei p83/100 (54,5 %), DbpA (53,3 %) und p58 (50 %) erfasst. Goettner et al. fanden in ihrer Arbeit eine höhere Sensitivität bei DbpA (72,9 %) und ähnliche Werte bei p100 (55,3 %) und p58 (55,3 %) (Goettner et al., 2005). Die niedrigste Kongruenzrate fand sich bei OspC mit nur 45,7 %.

Diskussion

IgG VIsE

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 70/78=89,7 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 21/23=91,3 %

VIsE IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot	positiv	69,3 % (70)	1 % (1)	6,9 % (7)	77,2 % (78)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
IgG	negativ	1 % (1)	1 % (1)	20,8 % (21)	22,8 % (23)
gesamt		70,3 % (71)	2 % (2)	27,7 % (28)	100 % (101)

IgG OspC

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 16/35=45,7 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 58/66=87,9 %

OspC IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot	positiv	15,8 % (16)	1 % (1)	17,8 % (18)	34,7 % (35)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
IgG	negativ	5 % (5)	3 % (3)	57,4 % (58)	65,3 % (66)
gesamt		20,8 % (21)	4 % (4)	75,2 % (76)	100 % (101)

IgG DbpA

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 16/30=53,3 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 47/71=66,2 %

Diskussion

DbpA IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	15,8 % (16)	1 % (1)	12,9 % (13)	29,7 % (30)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	22,8 % (23)	1 % (1)	46,5 % (47)	70,3 % (71)
gesamt		38,6 % (39)	2 % (2)	59,4 % (60)	100 % (101)

IgG p83/100

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 12/22=54,5 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 69/73=94,5 %

p83/100 IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	11,9 % (12)	3 % (3)	6,9 % (7)	21,8 % (22)
	grenzwertig	0 % (0)	3 % (3)	3 % (3)	5,9 % (6)
	negativ	2 % (2)	2 % (2)	68,3 % (69)	72,3 % (73)
gesamt		13,9 % (14)	7,9 % (8)	78,2 % (79)	100 % (101)

IgG p58

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 8/16=50 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 80/85=94,1 %

p58 IgG		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	7,9 % (8)	1 % (1)	7 % (7)	15,8 % (16)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	2 % (2)	3 % (3)	79,2 % (80)	84,2 % (85)
gesamt		10 % (10)	4 % (4)	86,1 % (87)	100 % (101)

5.1.2 IgM

Der Multianalyt-B.-burgdorferi-IgM-Test zeigte im Gesamtbefund bei 77,2 % der Fälle ein identisches Ergebnis wie der LineBlot.

IgM Gesamt

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: $34/56=60,7\%$

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: $44/45=97,8\%$

Gesamt IgM		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	33,7 % (34)	3 % (3)	18,8 % (19)	55,4 % (56)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	1 % (1)	0 % (0)	43,6 % (44)	44,6 % (45)
gesamt		34,7 % (35)	3 % (3)	62,4 % (63)	100 % (101)

Die höchste Übereinstimmung der Antigene mit der Standardmethode (Immunoblot) fiel bei OspC (83,2 %) auf. In der Vergangenheit wurde OspC von mehreren Autoren als der sensitivste Marker für die Detektion von IgM-Antikörpern angesehen (Hauser et al., 1997; Wilske et al., 1993), was sich auch hier bestätigen ließ.

Von den insgesamt nur 6 positiven IgM-VlsE-Ergebnissen (5,9 %) im Immunoblot konnte keines im Multianalyt bestätigt werden. Hierfür könnten zwei Gründe ausschlaggebend sein. Obwohl IgM-Antikörper gegen VlsE schon im Frühstadium entstehen, ist ihr Nachweis zumeist selten (Schulte-Spechtel, 2003). Darüber hinaus nutzt der Multianalyt-Test VlsE-Antigene vom Stamm B. garinii PBi. VlsE-Antigene dieses Stammes zeigten auch bei anderen Studien niedrige Sensitivitäten um die 5 % (Schulte-Spechtel, 2003).

Das Antigen p41i (0 %) erwies sich nicht als sensitiver Marker für den IgM-Test.

Dieses Flagellin-Protein ist jedoch nur bedingt spezifisch für den Nachweis von Borrelien-Antikörpern, da Kreuzreaktionen mit weiteren Spirochäten bekannt sind (Alfen et al., 1994; Wallich et al., 1990; Zöller et al., 1991). Die Bemerkung diverser Vorgängerstudien, dass Antikörper gegen p41 schon zu Beginn im IgM-LineBlot zu

Diskussion

finden sind (Sivak et al., 1996; Hauser et al., 1997; Steere 2000), lässt sich jedoch nicht auf die hier angewandte durchflusszytometrische Methode übertragen. Von den im LineBlot 61 positiv gefundenen Seren wurde keines bezüglich p41 vom Multianalyt bestätigt. Erwähnenswert ist, dass im Multianalyt das Antigen p41i vom Stamm B. burgdorferi sensu stricto eingesetzt wird. Im Gegensatz hierzu bedient sich ViraStripe des p41 aus B. afzelii. Die unterschiedlichen Herkünfte des Antigens sind möglicherweise ein weiterer Grund für die niedrige Konvergenz der zwei Analysemethoden.

IgM VlsE

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 0/6=0 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 87/95=91,6 %

VlsE IgM		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	0 % (0)	2 % (2)	4 % (4)	6 % (6)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	3 % (3)	5 % (5)	86,1 % (87)	94,1 % (95)
gesamt		3 % (3)	7 % (7)	90,1 % (91)	100 % (101)

IgM OspC

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 33/47=70,2 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 51/54=94,4 %

OspC IgM		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	32,7 % (33)	2 % (2)	11,9 % (12)	46,5 % (47)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	2 % (2)	1 % (1)	50,5 % (51)	53,5 % (54)
gesamt		34,7 % (35)	3 % (3)	62,3 % (63)	100 % (101)

Diskussion

IgM p41

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 0/61=0 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 38/40=95 %

p41 IgM		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot	positiv	0 % (0)	1 % (1)	59,4 % (60)	60,4 % (61)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
IgM	negativ	1 % (1)	1 % (1)	37,6 % (38)	39,6 % (40)
gesamt		1 % (1)	2 % (2)	97 % (98)	100 % (101)

5.2 Kongruenz der negativen Ergebnisse

Die Kongruenz der negativen Ergebnisse im IgG-Gesamtbefund betrug 90,5 %.

Für kommerziell erhältliche Westernblots wurden bisher Werte von 90-97 % beim IgG-Test angegeben (Mogilyansky et al., 2004). Somit erreicht die durchflusszytometrische Methode in Hinblick auf die Spezifität leistungstechnisch die Werte der etablierten Westernblot-Methode.

Die höchste Übereinstimmung der negativen Antigenergebnisse trat bei p83/100 (94,5 %) auf. Der hohe Spezifitätswert von p83/100 im IgG-Suchtest wurde schon in anderen Arbeiten bestätigt (Hauser et al., 1997). Dies kann durch die hochspezifische Rolle des p83/100 als Oberflächenprotein der Membranvesikel erklärt werden.

Eine Spezifität über 90 % trat auch bei p58 (94,1 %) und VlsE (91,3 %) auf.

Die Kongruenz der negativen IgM-Gesamtbefunde lag bei 97,8 %.

Die höchste Übereinstimmung der negativen Antigenergebnisse ergab sich bei p41i (95 %). Dies ist dahingehend bemerkenswert, da p41i als nur bedingt spezifisches Antigen oft falsch-positive Ergebnisse liefert. Dies ist bedingt durch häufige Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten und weiteren geißeltragenden Bakterien (Alfen et al., 1994; Wilske et al., 1990; Zoller et al., 1991).

5.3 Frühinfektionen – Sensitivität

5.3.1 IgG

Die hier erreichten Sensitivitätswerte im Multianalyt lagen für die lokalisierten Frühinfektionen bei 61,5 % (24 von 39 Proben) für IgG. Entsprechend betrug die Sensitivität mit dem viramed LineBlot 79,5 % (31 von 39 Proben). In der Literatur werden für andere IgG-Immunooblots Werte von 73,3 % bis 86,7 % bei Frühinfektionsseren angegeben (Goettner et al., 2005).

Die beiden von uns eingesetzten Methoden hatten eine Konvergenzrate von 76,9 % (30 von 39). Wichtig zu erwähnen ist, dass die restlichen 23,1 % (9 von 39) der nicht übereinstimmenden Seren jeweils von einer der beiden Methoden als grenzwertig eingestuft wurden. Alle im Immunoblot als positiv befundenen Proben waren im Multianalyt positiv oder grenzwertig ohne falsch-positive Ergebnisse.

IgG Gesamt Frühinfektionen

LineBlot Sensitivität: 32/39=82,1 %

Multianalyt Sensitivität: 24/39=61,5 %

Gesamt IgG Frühinfektionen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	61,5 % (24)	20,5 % (8)	0 % (0)	82,1 % (32)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	2,6 % (1)	2,6 % (1)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	15,4 % (6)	15,4 % (6)
gesamt		61,5 % (24)	20,5 % (8)	18 % (7)	100 % (39)

Die höchste Sensitivität aller Antigene zeigten beide Tests bei VlsE an. Beim Multianalyt betrug die Sensitivität hierbei 69,2 % (27 von 39). Das vom Multianalyt eingesetzte Antigen VlsE vom Stamm P. garinii zeigte in anderen Tests die höchste Sensitivität an (Goettner et al., 2005). Der LineBlot erreichte mit 79,5% (31 von 39) eine noch höhere Sensitivität.

Diskussion

Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeit von Goettner et al. überein. Im Test mit einem rekombinanten IgG-LineBlot fanden sie Antikörper gegen VlsE in 80 % der EM-Seren. Hiermit bewiesen sie die Signifikanz des VlsE unter allen Banden des IgG-LineBlots, insbesondere bei Frühmanifestationen der Borreliose (Goettner et al., 2005). Die Konvergenz lag bei 84,6 % (33 von 39).

IgG VlsE

LineBlot Sensitivität: 31/39=79,5 %

Multianalyt Sensitivität: 27/39=69,2 %

VlsE IgG Frühinfektionen		Multianalyt IgG			Gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	61,5 % (26)	2,6 % (1)	10,3 % (4)	79,5 % (31)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	2,6 % (1)	0 % (0)	17,9 % (7)	20,5 % (8)
gesamt		69,2 % (27)	2,6 % (1)	28,2 % (11)	100 % (39)

Die höchste Übereinstimmung erreichten die beiden Tests bei p58 mit 94,9 % (37 von 39), welches bereits in anderen Studien als hochsensitives Protein beschrieben wurde (Hauser 1997).

IgG p58

LineBlot Sensitivität: 3/39=7,7 %

Multianalyt Sensitivität: 2/39=5,1 %

Diskussion

p58 IgG Frühinfektionen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	5,1 % (2)	0 % (0)	2,6 % (1)	7,7 % (3)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	2,6 % (1)	89,7 % (35)	92,3 % (36)
gesamt		5,1 % (2)	2,6 % (1)	92,3 % (36)	100 % (39)

5.3.2 IgM

In der Literatur werden für kommerziell erhältliche Immunoblot-Tests für IgM Werte um 36 % angegeben (Vaz et al., 2001).

Bei den 39 untersuchten Frühinfektionsseren erreichte das LineBlot-Verfahren eine Sensibilität von 53,8 %. Der IgM-Multianalyt stufte 14 dieser Seren als positiv ein und hatte somit eine Sensitivität von 35,9 %.

IgM Gesamt Frühinfektionen

Immunoblot Sensitivität: $21/18=53,8\%$

Multianalyt Sensitivität: $14/39=35,9\%$

Gesamt IgM Frühinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	35,9 % (14)	2,6 % (1)	0 % (6)	53,8 % (21)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	46,2 % (18)	46,2 % (18)
gesamt		35,9 % (14)	2,6 % (1)	61,5 % (24)	100 % (39)

Das sensibelste Antigen im LineBlot mit 56,4 % war p41. Die Sensibilitätsrate für p41 im IgM-Test entspricht derjenigen anderer Arbeiten, in denen Werte von 60 % bei

Diskussion

Frühinfektionen verzeichnet wurden (Goettner et al., 2005). Jedoch fiel die Ausbeute der positiven p41-Ergebnisse im Multianalyt mit 2,6% sehr niedrig aus (1 von 39).

IgM p41

LineBlot Sensitivität: 22/39=56,4 %

Multianalyt Sensitivität: 1/39=2,6 %

p41 IgM Frühinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	0 % (0)	0 % (0)	56,4 % (22)	56,4 % (22)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	2,6 % (1)	0 % (0)	41 % (16)	43,6 % (17)
gesamt		2,6 % (1)	0 % (0)	97,4 % (38)	100 % (39)

Im Gegensatz dazu hatte im Multianalyt OspC die höchste IgM-Sensitivität (35,9 %). In der Literatur gilt OspC als bester Marker für die spezifische IgM-Antikörpersuche (Hauser et al., 1997; Wilske et al., 1986, 1993). Für Frühinfektionen werden im Vergleich dazu in Immunoblots Werte von 80 % angegeben.

Die beiden Methoden hatten eine Konvergenzrate von 82,1 % (32 von 39).

Die höchste Übereinstimmung der beiden Tests bei den IgM-Antigenen bestand bei OspC mit 92,3 % (36 von 39).

Diskussion

IgM OspC

LineBlot Sensitivität: 17/39=43,6 %

Multianalyt Sensitivität: 14/39=35,9 %

OspC IgM Frühinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	35,9 % (14)	0 % (0)	7,7 % (3)	43,6 % (17)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	56,4 % (22)	56,4 % (22)
gesamt		35,9 % (14)	0 % (0)	64,1 % (25)	100 % (39)

5.4 Spätinfektionen – Sensitivität

5.4.1 IgG

Bei den Seren von Spätmanifestationen erreichte das LineBlot-Verfahren eine IgG-Sensibilitätsrate von 100 % (35 von 35). Analog dazu wurden beim durchflusszytometrischen Test 85,7 % (30 von 35) der Seren als richtig positiv eingestuft. Beide Methoden hatten eine Kovergenzrate von 85,7 %. Somit wurde von den drei Gruppeneinteilungen (Frühinfektionen; Spätinfektionen; atypische, anderweitige Diagnosen) die höchste Übereinstimmungsrate bei den Spätinfektionen in den IgG-Tests erreicht.

Diskussion

IgG Gesamt Spätinfektionen

LineBlot Sensitivität: 35/35=100 %

Multianalyt Sensitivität: 30/35=85,7 %

Gesamt IgG Spätinfektionen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	85,7 % (30)	11,4 % (4)	2,9 % (1)	100 % (35)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
gesamt		85,7 % (30)	11,4 % (4)	2,9 % (1)	100 % (35)

Als sensitivstes Antigen stellte sich VlsE bei beiden Verfahren heraus. Im LineBlot fand es sich in 100 % (35 von 35) und im Multianalyt in 94,3 % (33 von 35) der Proben. Die Konvergenz lag somit analog bei 94,3 % (33 von 35). Hierbei zeigte sich VlsE als besonders sensibler Marker auch bei Spätmanifestationen der Lyme-Borreliose. Die hohe Sensitivitätsrate dieses Antigens beruht auf seiner konservierten immunodominanten Region IR-6 (Liang et al., 1999a).

IgG VlsE Spätinfektionen

LineBlot Sensitivität: 35/35=100 %

Multianalyt Sensitivität: 33/35=94,3 %

Gesamt VlsE Spätinfektionen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	94,3 % (33)	0 % (0)	5,7 % (2)	100 % (35)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
gesamt		94,3 % (33)	0 % (0)	5,7 % (2)	100 % (35)

5.4.2 IgM

In der Literatur gelten IgM-Analysen generell als nicht wegweisend für die Diagnose bei Spätinfektionen (Wilske et al., 2000). Dies beruht darauf, dass die IgM-Antikörper meistens nur noch wenige Monate nach Entstehung nachweisbar sind. Eine Produktion dieser in Spätmanifestationen kann zwei Gründe haben. Einerseits besteht die Möglichkeit der Reaktivierung einer latenten Infektion. Andererseits kann in solchen Fällen eine virus- oder autoimmunerkrankungsbedingte Stimulierung der unspezifischen polyklonalen B-Zellen ausschlaggebend sein.

Dementsprechend wurden auch bei den zwei Diagnoseverfahren niedrige Sensitivitätswerte erreicht. Im Immunoblot wurden nur 54,3 % (19 von 35) der Spätmanifestationsseren als IgM-positiv erkannt. Der Multianalyt stufte hierbei nur 37,1 % (13 von 35) als positiv ein. Trotz dieser niedrigen Werte stimmten die Methoden in 82,9 % (29 von 35) der Fälle überein.

IgM Gesamt Spätinfektionen

LineBlot Sensitivität: 19/35=54,3 %

Multianalyt Sensitivität: 13/35=37,1 %

Gesamt IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	37,1 % (13)	2,9 % (1)	14,3 % (5)	54,3 % (19)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	45,7 % (16)	45,7 % (16)
gesamt		37,1 % (13)	2,9 % (1)	60 % (21)	100 % (35)

Das sensitivste Antigen war bei beiden Methoden im IgM-Suchverfahren OspC. In anderen Arbeiten wurde schon die Schlüsselrolle von OspC im spezifischen IgM-Antikörpersuchtest hervorgehoben (Wilske et al., 1986, 1993; Hauser et al., 1997). Im Immunoblot reagierten 48,6 % (17 von 35) der Spätmanifestationsseren positiv. Bei

Diskussion

37,1 % (13 von 35) dieser Proben zeigte der Multianalyt ein positives Ergebnis bezüglich OspC an.

Die Konvergenzrate bezüglich dieses Antigens lag bei 85,7 % (30 von 35). Analog zu den Ergebnissen der Frühinfektionsseren fand sich auch bei den Spätinfektionsseren die höchste Übereinstimmung bei OspC. Beide Methoden nutzen das OspC-Antigen vom Stamm B. afzelii, welches das sensitivste aller homologen Antigene ist (Goettner et al., 2005).

IgM OspC Spätinfektionen

LineBlot Sensitivität: 17/35=43,6 %

Multianalyt Sensitivität: 13/35=37,1 %

OspC IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	37,1 % (13)	2,9 % (1)	8,6 % (3)	43,6 % (17)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	2,9 % (1)	0 % (0)	48,6 % (17)	51,4 % (18)
gesamt		37,1 % (13)	2,9 % (1)	57,1 % (20)	100 % (35)

Wie zu erwarten war, fand sich VlsE nur selten in den IgM-spezifischen Suchtests der Spätmanifestationsseren, nämlich nur in 8,6 % (3 von 35) im IgM-Immunoblot und in 4,9 % (2 von 35) im IgM-Multianalyt.

Bemerkenswert war die niedrige Übereinstimmung der beiden Methoden bezüglich des Antigens p41. Nur in 37,1 % (13 von 35) der Fälle zeigten die Testverfahren ein identisches Ergebnis an. Hierbei betrug die Sensitivität des Multianalyt bezüglich p41 0% (0 von 35). Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Herkunft der eingesetzten Antigene der beiden Methoden bieten. Im Multianalyt der Firma virion/serion wird ein Antigen p41 vom Stamm B. burgdorferi sensu stricto eingesetzt. Hingegen stammt das p41 des viramed Virastripe vom Stamm B. afzelii.

Diskussion

IgM p41 Spätinfektionen

ImmunoBlot Sensitivität: 21/35=60 %

Multianalyt Sensitivität: 0/35=0 %

p41 IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	0 % (0)	0 % (0)	60 % (21)	60 % (21)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	2,9 % (1)	37,1 % (13)	40 % (14)
gesamt		0 % (0)	2,9 % (1)	97,1 % (34)	100 % (35)

5.5 Atypische, anderweitige Diagnosen – Sensitivität

5.5.1 IgG

Bei den atypischen, anderweitigen Diagnosen waren 37 % (10 von 27) im IgG-ViraStripe positiv. Die durchflusszytometrische Methode befand 33,3 % (9 von 27) dieser Seren als positiv. Die Konvergenzrate beider Tests lag bei 92,6 % (25 von 27).

IgG Gesamt atypische, anderweitige Diagnosen

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 7/10=70 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 13/14=92,3 %

Diskussion

Gesamt IgG atypische, anderweitige Diagnosen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	25,9 % (7)	3,7 % (1)	7,4 % (2)	37 % (10)
	grenzwertig	3,7 % (1)	7,4 % (2)	0 % (0)	11,1 % (3)
	negativ	3,7 % (1)	0 % (0)	48,1 % (13)	51,9 % (14)
gesamt		33,3 % (9)	11,1 % (3)	55,6 % (15)	100 % (27)

Beide Methoden erreichten die höchste Positivrate der Antigene bei VIsE. Im Immunoblot waren es 44,4 % (12 von 27) und im Multianalyt 40,7 % (11 von 27). In 92,6 % (25 von 27) der Fälle stimmten diese Ergebnisse miteinander überein.

IgG VIsE atypische, anderweitige Diagnosen

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 11/12=91,7 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 14/15=93,3 %

VIsE IgG atypische, anderweitige Diagnosen		Multianalyt IgG			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgG	positiv	40,7 % (11)	0 % (0)	3,7 % (1)	44,4 % (12)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	3,7 % (1)	51,9 % (14)	55,6 % (15)
gesamt		40,1 % (11)	3,7 % (1)	55,6 % (15)	100 % (27)

5.5.2 IgM

Im IgM-Immunoblot waren 59,3 % (16 von 27) der atypischen, anderweitigen Diagnoseseren positiv. Entsprechend waren nur 29,6 % (8 von 27) dieser Proben positiv im Multianalyt. Bei diesen Seren lag eine Übereinstimmungsrate von 63 % (17 von 23) vor.

IgM Gesamt atypische, anderweitige Diagnosen

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 6/15=40 %

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 10/16=63 %

Gesamt IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	26 % (7)	3,7 % (1)	29,6 % (8)	59,3 % (16)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	3,7 % (1)	0 % (0)	37 % (10)	40,7 % (11)
gesamt		29,6 % (8)	3,7 % (1)	66,7 % (18)	100 % (27)

Genau wie bei den IgG-Tests war VlsE das Antigen mit der höchsten Anzahl positiver Ergebnisse. 100 % (27 von 27) der Seren reagierten positiv darauf im IgM-Immunoblot. Im IgM-Multianalyt waren 88,9 % (24 von 27) dieser Proben positiv auf VlsE, wobei die restlichen 11,1 % (3 von 27) grenzwertig waren. Die Kongruenzrate der beiden Diagnosemethoden lag bei 88,8 % (24 von 27). Hierbei gab es keine unterschiedlichen Ergebnisse, da die 11,1 % von grenzwertigen Ergebnissen gebildet wurden.

IgM VlsE atypische, anderweitige Diagnosen

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 0/0

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 24/24=100 %

Diskussion

VIsE IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	11,1 % (3)	88,9 % (24)	88,9 % (24)
gesamt		0 % (0)	11,1 % (3)	88,9 % (24)	100 % (27)

Bemerkenswert war die niedrige Konvergenzrate beider Tests bezüglich der p41-Ergebnisse. Bei dieser Serengruppe lag diese bei nur 33,3 % (9 von 27). Hierbei fiel auf, dass im Multianalyt 92,6 % (25 von 27) als negativ und die restlichen 7,4 % (2 von 27) als grenzwertig eingestuft wurden, ohne dass es ein positives Ergebnis gab. Im Gegensatz dazu waren 66,7 % (18 von 27) im Immunoblot positiv. Die Diskrepanz der beiden Resultate bezüglich p41 war ebenfalls im IgM der Spätmanifestationsseren markant.

IgM p41 atypische, anderweitige Diagnosen

Übereinstimmung positiver Ergebnisse: 0/0

Übereinstimmung negativer Ergebnisse: 9/9=100 %

p41 IgM Spätinfektionen		Multianalyt IgM			gesamt
		positiv	grenzwertig	negativ	
LineBlot IgM	positiv	0 % (0)	7,4 % (2)	59,3 % (16)	66,7 % (18)
	grenzwertig	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)
	negativ	0 % (0)	0 % (0)	33,3 % (9)	33,3 % (9)
gesamt		0 % (0)	7,4 % (2)	92,6 % (25)	100 % (27)

5.6 Auswertungsunterschiede der beiden Methoden

5.6.1 Interpretation der Gesamtergebnisse – IgG-Reihe

Die Übereinstimmung des Gesamtbefundes der positiven Seren der IgG-Reihe lag bei 80,8 %. Entsprechend betrug die Übereinstimmung der negativen Ergebnisse 90,5 %.

Die Übereinstimmungswerte der richtig-positiven Ergebnisse lassen sich mit einem Blick auf die grenzwertigen Ergebnisse des Multianalyt-IgG erklären. Diese machen 11,9 % aller entsprechenden positiven Befunde des LineBlot-IgG aus. Würde man die grenzwertigen Werte nicht in Betracht ziehen, ergäbe sich eine Sensitivität von 95,5 %. Die Diskrepanz dieser beiden Daten, 80,8 % zu 95,5 %, lässt sich durch die unterschiedlichen Auswertungskriterien beider Diagnosemethoden erklären.

Ein grenzwertiges Ergebnis tritt im Immunoblot dann auf, wenn einzig die VlsE-Bande positiv ist.

Im Gegensatz dazu tritt dieses im Multianalyt auf, wenn 3-6 Punkte in der Gesamtinterpretation erreicht werden. Hierfür können beispielsweise außer des VlsE-Analyts auch die folgenden Analyte separat positiv sein: p100, OspC, DbpA Pko, p58 oder p41i. Darüber hinaus können mit einem positiven VlsE zusätzlich andere Analyte grenzwertig oder positiv sein, um ein gesamtgrenzwertiges Ergebnis zu bewirken. In der folgenden Tabelle werden die möglichen Konstellationen für ein grenzwertiges Multianalyt-IgG-Ergebnis dargestellt.

Tabelle 5.6.1-1: Punkteinterpretation der Antikörpertiter im Multianalyt

VlsE	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 4 Punkte
p100	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 4 Punkte
OspC	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 4 Punkte
DbpA PBr	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 3 Punkte
DbpA Pko	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 3 Punkte
p58	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 4 Punkte
p41i	10-15 U/ml = 2 Punkte	>15 U/ml = 4 Punkte
Lysat	10-15 U/ml = 1 Punkte	>15 U/ml = 2 Punkte

Hierbei lässt sich zeigen, wie breit die Möglichkeiten für ein grenzwertiges Ergebnis bei der durchflusszytometrischen im Gegensatz zur Immunoblot-Methode sind. Diese

Tatsache erklärt auch den höheren Anteil grenzwertiger IgG-Ergebnisse im Multianalyt (12,9 %) im Vergleich zum Immunoblot (2 %), welche wir in unseren Tests fanden.

5.6.2 Interpretation der einzelnen Antikörperergebnisse – IgG-Reihe

Die am besten korrelierenden Antigenergebnisse waren im Gesamttest, wie erwartet, diejenigen von VlsE-IgG mit 89,7 % (70 von 78). Die Rolle des VlsE als hochsensitives Antigen bei der Diagnose der Borreliose lässt sich dadurch erklären, dass es die konservierte immunodominante Region IR-6 enthält (Liang et al., 1999a).

Einen Unterschied der beiden Diagnosemethoden stellt die mögliche Bewertung der Antikörperkonzentrationen dar. Die Bandenbewertung im Immunoblot ist wie folgt: Wenn eine Bandenintensität gleich oder größer als die Cut-off-Kontrolle ist, wird sie als positiv gewertet. Ist ihre Intensität kleiner als die Kontrolle, so wird sie als negativ angesehen. Somit gibt dieser Test bezüglich der Antigene nur ein positives oder negatives Resultat an. Dagegen können im Serion-Multianalyt die gefundenen Antikörper grenzwertige Titer aufweisen, wenn sie zwischen 10-15 U/ml liegen. Damit erlaubt die durchflusszytometrische Methode eine spezifischere Analyse der gesuchten Antigene.

5.6.3 Interpretation der Ergebnisse – IgM-Reihe

Die Übereinstimmung des Gesamtbefundes der positiven Seren der IgM-Reihe lag bei 60,7 %. Entsprechend betrug diejenige der negativen Ergebnisse 98,7 %.

Im Gegensatz zu der Kongruenz der beiden IgG-Testergebnisse lässt sich die niedrigere Übereinstimmung der positiven Ergebnisse bei IgM nicht mit einem hohen Anteil grenzwertiger Ergebnisse erklären. Diese machten insgesamt nur 3 % (3 von 101) aus. Ein Grund für diese Diskrepanz könnten die unterschiedlich analysierten Antigene der beiden Methoden und deren Anzahl sein. Im Immunoblot werden Antikörper gegen fünf Antigene, VlsE, Osp17, OspC, p39 und p41, gesucht. Dagegen setzt der Multianalyt auf acht Analyte, VlsE, p100, OspC, Dbpa PBr, DbpA PKo, p58, p41i und Lysat.

Die niedrigste Sensitivität in der durchflusszytometrischen Methode fand sich bei der Analyse von IgM p41. Von den im Immunoblot 61 positiven Proben wurde keine im Multianalyt bestätigt. Somit ergab sich in diesem Fall eine Sensitivität von 0 %. Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Herkünfte der eingesetzten Antigene sein. Im

Diskussion

Multianalyt der Firma virion/serion wird ein Antigen p41 vom Stamm B. burgdorferi sensu stricto benutzt. Hingegen stammt das p41 des viramed Virastripe vom Stamm B. afzelli. Obwohl normalerweise die Antigene speziesübergreifend reagieren, sind höhere Sensitivitäten bei Antigenen aus bestimmten Spezies bekannt (Goettner et al., 2005). Darüber hinaus könnte auch im Multianalyt die Bindung des p41 an dem Sondenmolekül (BEAD) für die niedrige Sensitivität ausschlaggebend sein. Eine Bindung, die keinen stabilen Antigen-Antikörper-Komplex erlaubt, wäre theoretisch als Grund für eine niedrige Sensitivität denkbar.

5.6.4 Darstellung der Ergebnisse

Der Hauptunterschied in der Ergebnisauswertung der beiden Tests liegt in der Messmethode.

Im ViraStripe binden IgG- oder IgM-Antikörper an die auf dem Teststreifen fixierten Antigene. Im nächsten Schritt bindet ein Alkalische-Phosphatase-Konjugat auf diesen Antigen-Antikörper-Komplex. Diese Bindung ergibt eine lila Umfärbung des Teststreifens. Wenn diese Farbintensität derjenigen der Cut-off-Linie gleichwertig oder stärker ist, gilt der Streifen als positiv. Somit bildet dieser Antikörpernachweis eine qualitative Messung, da nur drei Intensitäten (negativ, grenzwertig und positiv) unterschieden werden können. Ein numerisches Ergebnis wird somit nicht geliefert.

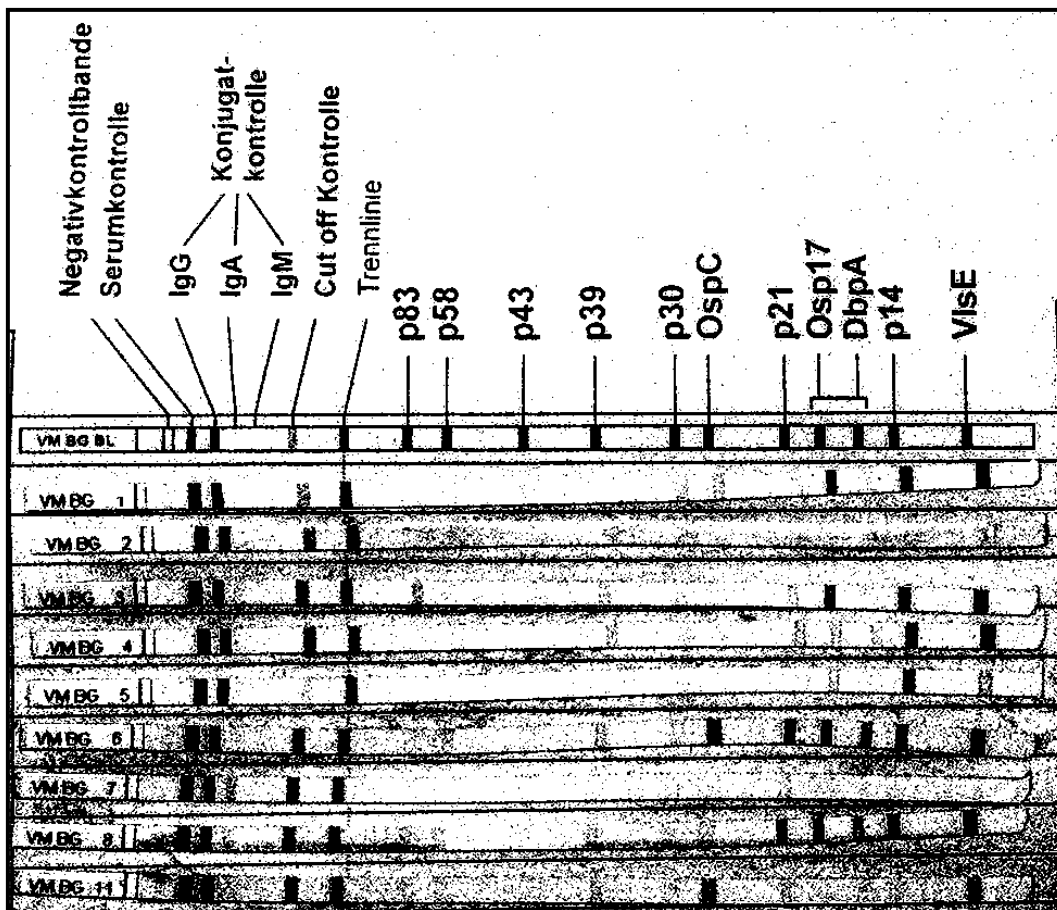


Abbildung 5.6.4-1: Entwickelte IgG viramed Immunoblots

Im Multianalyt binden markierte Detektormoleküle an den Antigen-Antikörper-Molekülen. Deren Menge wird dann vom Durchflusszytometer gemessen und in der easy-Plex-Software analysiert. Diese bietet dann genaue Ergebnisse für jedes Antigen in U/ml und gibt gleichzeitig eine Wertigkeit dafür an. Dadurch stellt die durchflusszytometrische Methode die Messergebnisse in quantitativer Form dar. Im Folgenden wird ein Beispiel eines solchen quantitativen IgG-Messergebnisses vom Serion Multianalyt gezeigt.

Diskussion

Charge / Plex		Gesamt		Analyt 1			Analyt 2			Analyt 3			Analyt 4		
MDC.AA	Borrelia gesamt IgG	Punkte	Bewertung	VisE			OspC			p100			DbpA-PBr		
				U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P
1		9	positiv	36,14	+	4	-11111,11	-	0	2,41	-	0	-11111,11	-	0
2		0	negativ	-11111,11	-	0	4,84	-	0	1,74	-	0	3,48	-	0
3		0	negativ	-11111,11	-	0	4,41	-	0	1,78	-	0	3,48	-	0
4		0	negativ	6,83	-	0	6,72	-	0	1,03	-	0	5,62	-	0
5		0	negativ	4,15	-	0	-11111,11	-	0	-11111,11	-	0	-11111,11	-	0
6		0	negativ	-11111,11	-	0	5,75	-	0	6,56	-	0	5,79	-	0
7		0	negativ	-11111,11	-	0	4,84	-	0	1,61	-	0	2,95	-	0
8		11	positiv	104,33	+	4	6,23	-	0	2,97	-	0	4,73	-	0
9		13	positiv	776,46	+	4	6,66	-	0	26,67	+	4	5,51	-	0
10		17	positiv	121,33	+	4	31,51	+	4	4,00	-	0	7,21	-	0

Charge / Plex		Gesamt		Analyt 5			Analyt 6			Analyt 7			Analyt 8		
MDC.AA	Borrelia gesamt IgG	Punkte	Bewertung	DbpA-PKo			p58			p41i			Lysat		
				U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P	U/ml	Bew.	P
1		9	positiv	138,15	+	3	1,60	-	0	1,34	-	0	17,92	+	2
2		0	negativ	-11111,11	-	0	0,71	-	0	0,68	-	0	5,30	-	0
3		0	negativ	1,26	-	0	0,76	-	0	0,90	-	0	-11111,11	-	0
4		0	negativ	1,56	-	0	1,06	-	0	-11111,11	-	0	-11111,11	-	0
5		0	negativ	3,82	-	0	-11111,11	-	0	-11111,11	-	0	-11111,11	-	0
6		0	negativ	1,70	-	0	2,31	-	0	5,93	-	0	-11111,11	-	0
7		0	negativ	-11111,11	-	0	2,08	-	0	0,88	-	0	-11111,11	-	0
8		11	positiv	99999,99	+	3	11,24	?	2	1,06	-	0	19,66	+	2
9		13	positiv	99999,99	+	3	7,39	-	0	1,01	-	0	21,33	+	2
10		17	positiv	998,95	+	3	50,88	+	4	0,93	-	0	102,68	+	2

Abbildung 5.6.4-2: Testergebnisse von Serion Multianalyt IgG

Der Multianalyt hat den maßgeblichen Vorteil, dass die Ergebnisse von der Software automatisch und objektiv ausgewertet werden. Somit unterliegt er nicht Schwankungen und Fehlern, welche von den auswertenden Personen beeinflusst werden können. Im Gegensatz dazu müssen die Immunoblots von speziell geschultem Personal optisch oder densitometrisch bewertet werden. Dieser Schritt kann eine zusätzliche Fehlerquelle darstellen und zur Ergebnisverfälschung führen.

Die Daten vom Multianalyt können als pdf-Dateien abgespeichert und somit exportiert oder an andere medizinische Institutionen (z. B. zur weiteren Abklärung) geschickt werden.

5.7 Einsatz der diagnostischen Methoden zur serologischen Verlaufskontrolle

Das serologische Gedächtnis besteht in zwei unterschiedlichen Formen. Die erste, antigenabhängige, Form bildet das Kurzzeitgedächtnis und die zweite Form, die antigenunabhängige, das Langzeitgedächtnis (Bernasconi et al., 2002). Die letztere Form ist die Residualimmunität, die einen bestehenden Schutz vor einer Reinfektion darstellt. Diese Tatsache ergibt auch die Schwierigkeit des Einsatzes von serologischen Diagnosemethoden zur Verlaufskontrolle. Auch nach einer ausreichenden Therapie ist es möglich, dass IgM- oder IgG-Antikörper weiterhin bestehen bleiben (Hammersbergren et al., 1994).

Da IgG-Antikörper über längere Zeit existieren können, sollte eine alleinige serologische Diagnose nicht als sichere Darstellung über die Entwicklung einer Infektion gelten. Die Kinetik der Antikörperkonzentrationen mithilfe von Seren zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor, während und nach der Therapie) ist dafür laut Literatur besser geeignet (Peltomaa et al., 2003).

Eine Überlegung wäre, insbesondere bei unklaren Fällen mit fraglichem Therapieerfolg, die Kinetik der Antikörpertiter aufzuzeichnen.

Für ein Verfahren der Messung dieser Kinetik wäre eine quantitative Messmethode nötig, um genaue Unterschiede in der Antikörperkonzentration erkennbar zu machen. Dies könnte eine mögliche zukünftige Einsatzstelle für die durchflusszytometrische Methode darstellen. Besonders bei zweifelhaften Fällen bestünde die Chance, dass exaktere Antikörpertiter in Verbindung mit der Klinik einen akkurateren Ergebnisverlauf bieten könnten. Hierbei steht der Weg frei für eine Arbeit in Zukunft, welche die Eignung einer solchen Verlaufskontrolle in Kombination mit klinischen Symptomen beurteilen könnte.

5.8 Verbesserungen in der praktischen Testdurchführung

Die Firma virion/serion empfahl in ihrem Durchführungsschema die Benutzung eines Dispensers mit Pipettenspitze zur Zugabe der rekonstituierten Partikellösung und des Konjugats in die einzelnen Kavitäten der Filterplatte. Die Spitze sollte nach jeder Kavität gewechselt werden, um eine Kontamination der einzelnen Kavitäten untereinander zu vermeiden. Mit dieser Methode fiel jedoch auf, dass ein gewisser Rest der

Diskussion

rekonstituierten Partikellösung innerhalb des Dispensers zu schäumen begann. Dieser Effekt wäre dahingehend kontraproduktiv, da eine Schaumbildung der BEADS das Ergebnis verfälschen kann. Hierbei fand sich ein Vorteil im Einsatz einer Pipette zur einzelnen Zugabe dieser Substanzen, da in diesem Fall der genannte Schäumungseffekt nicht auftrat.

6 Zusammenfassung

Für die Diagnose einer Borreliose bilden die serologischen Antikörpersuchtests in Kombination mit der klinischen Symptomatik heutzutage den Standard. Bisher wurde der indirekte Erregernachweis mittels zweier Verfahren durchgeführt: dem ELISA und Westernblot. Beide Diagnosemethoden sind der etablierte Standard und stellen ihre positiven Ergebnisse mittels Farbumschlägen dar, welche die Menge der Antigen-Antikörper-Komplexe aufzeigen. Ziel unserer Studie war es, eine neue durchflusszytometrische Methode zur Detektion von Borrelienantikörpern zu testen und die Ergebnisse mit den Ergebnissen der in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein eingesetzten Methode des Immunoblots zu vergleichen.

Hierbei wurden 101 Seren von Patienten untersucht, die mit dem Verdacht auf eine etablierte Borreliosefrühinfektion oder -spätinfektion in die Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein kamen. Die Patienten wurden aufgrund ihrer Anamnese und klinischen Symptomatik in drei Gruppen eingeteilt: Frühinfektionen, Spätinfektionen und atypische, anderweitige Diagnosen. In die Frühinfektionsgruppe wurden Patienten mit EM, MEM und Lymphozytom eingeteilt. Die Spätinfektionsgruppe umfasste die Diagnosen ACA, Lyme-Arthritis und Neuroborreliose. Patienten, die keine der oben genannten Symptome zeigten, aber einen Verdacht auf eine Borrelioseinfektion hatten, wurden der Gruppe der atypischen, anderweitigen Diagnosen zugeteilt.

Von allen untersuchten Patienten lagen positive ELISA-Tests vor und zusätzliche Immunoblot-Tests zur Bestätigung des Verdachts einer Infektion. Letztere wurden zum Vergleich mit der neu entwickelten durchflusszytometrischen Testvariante herangezogen. In unserer Arbeit wurden jeweils die IgG- und IgM-Gesamtergebnisse und die entsprechenden einzelnen Antikörperresultate von VlsE, OspC, p83/100, DbpA und p58 (alle aus IgG) und VlsE, OspC und p41 (alle aus IgM) gegenübergestellt.

Die Durchführung des Multianalyts wurde entsprechend der Einweisung von virion/serion und der Gebrauchsanweisung in den vorausgesetzten Laborbedingungen gemacht. Bei folgender Auswertung muss in Betracht gezogen werden, dass beide Methoden unterschiedliche Antigene untersuchen und andere Wertungssysteme aufweisen, somit auch Ergebnisabweichungen von diesen Faktoren beeinflusst werden.

Insgesamt zeigte sich beim Multianalyt-Testverfahren eine niedrigere Sensitivität als in

Zusammenfassung

der etablierten Immunoblot-Methode. Im Immunoblot-IgG wurden 67 der 74 Seren (Früh- und Spätinfektionen) als positiv bewertet, wobei aber nur 54 vom Multianalyt-IgG bestätigt werden konnten. Die Sensitivität war somit beim Immunoblot mit 90,5 % höher als beim Multianalyt, welche in diesem Fall 73 % betrug.

Im IgM-Test der Frühinfektionsfälle fanden sich im Immunoblot 21 positive von insgesamt 39 Seren, wobei 14 im Multianalyt auch als positiv eingestuft wurden. Bezüglich IgM lag die Sensitivität vom Immunoblot bei 53,9 % und vom Multianalyt bei 35,9 %.

Von den untersuchten IgG-Antikörpern ergaben sich jeweils die höchsten Sensitivitäten bei VlsE. Dabei waren 66 der 101 Seren diesbezüglich positiv im Immunoblot und analogerweise 60 im Multianalyt. Somit war der Immunoblot mit 89,2 % sensitiver gegenüber dem Multianalyt mit 81,1%.

Die Erkennung negativer Proben der neuen durchflusszytometrischen Methode ergab im Vergleich bessere Werte. Von den insgesamt 21 im Immunoblot-IgG als negativ befundenen Seren wurden 19 im Multianalyt bestätigt. Die Kongruenz lag hierbei bei 90,5 %.

Im IgM-Test fanden sich im Immunoblot 45 negative Proben, von denen 44 auch im Multianalyt negativ bewertet wurden. Somit verzeichnete sich hier die höchste Kongruenz negativer Resultate mit 97,8 %.

Die Diskrepanz der Testergebnisse beider Methoden könnte drei Gründe haben.

Erstens unterscheiden sich beide Testverfahren in der Interpretation der Antigenergebnisse. Die etablierte Immunoblot-Methode zeigt nur qualitative Ergebnisse (positiv oder negativ) an, wobei der Multianalyt quantitative Resultate in U/ml angibt und diesen mithilfe der easy-Plex-Software eine Wertigkeit zugeordnet wird. Dabei sind nur in der durchflusszytometrischen Methode grenzwertige Antigenergebnisse möglich, ein Faktor, welcher nicht unwesentlich die Sensitivität in unserem Test herabsetzte.

Zweitens untersuchen die zwei Testverfahren eine unterschiedliche Anzahl von Antigenen. Bei beiden Verfahren tragen die einzelnen Resultate zum Gesamtergebnis bei. Dadurch muss bedacht werden, dass die direkt miteinander verglichenen IgG- und IgM-Gesamtergebnisse von den unterschiedlichen Antigenresultaten beeinflusst sind und somit Schwankungen unterliegen.

Drittens besteht nur beim Multianalyt die Möglichkeit für ein grenzwertiges IgG- oder IgM-Gesamtergebnis. Beim Immunoblot kann nur der IgG-Test ein grenzwertiges Gesamtergebnis anzeigen und nur unter der Voraussetzung einer alleinigen positiven VlsE-Bande. Bei der durchflusszytometrischen Methode bestehen multiple Optionen für ein grenzwertiges Ergebnis. Somit ist auch die Wahrscheinlichkeit eines solchen

Zusammenfassung

grenzwertigen Ergebnisses in diesem Fall höher.

Die genannten Unterschiede der Ergebnisauswertung und -darstellung sollten in der Auswertung als Einflussfaktoren zusätzlich bedacht werden.

Abschließend zeigt sich, dass die durchflusszytometrische Methode eine höhere Detektionsrate insbesondere bei den manifestierteren Infektionen mit positivem IgG-Titer besitzt. Insgesamt war die Ausbeute der negativen Ergebnisse höher, weshalb ein Einsatz dieses Tests zur Kontrolle negativer Proben in Erwägung gezogen werden kann. In Verbindung mit den genaueren quantitativen Antikörpertitern könnte die durchflusszytometrische Methode in Zukunft insbesondere zur exakteren Abklärung bei fraglichen Infektionen eingesetzt werden.

7 Literaturverzeichnis

Afzelius, A. (1910)

"Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm."

Arch Dermatol Syph 101: 404.

Aguero-Rosenfeld, M. (1993)

"Serodiagnosis in early Lyme disease."

J clin Microbiol. 3090-3095

Alfen, I., Wellensiek, H.J., (1994)

"Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme - Borreliose und der Syphilis."

Lab. Med. (18):12 - 19

Anderson, J. F., R. C. Johnson, L. A. Magnarelli and F. W. Hyde (1985)

"Identification of endemic foci of Lyme disease: isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*)."

J Clin Microbiol 22 (1): 36-8.

Anderson, J. F., R. C. Johnson, L. A. Magnarelli and F. W. Hyde (1986)

"Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*." Infect Immun 51 (2): 394-6.

Asbrink, E., Hovmark, A., (1985)

"Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migrans afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans"

Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 93: 161-163

Asbrink, E., Hovmark, A., (1985)

"Successful cultivation of spirochetes from skin lesions of patients with erythema chronicum migransafzelius and acrodermatitis chronica atrophicans"

Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 93: 161-163

Balmelli, T., Piffaretti, J.C., (1995)

“Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*”

Res. Microbiol. 146: 329-340

Bannwarth, A. (1941)

"Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Ein Beitrag zum Problem „Allergie und Nervensystem“."

Arch Psychiatr Nervenkr. 113: 284-376.

Barbour, A.G., (1984)

"Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes"

Yale J. Biol. Med. 57: 521-525

Barbour, A. G., S. L. Tessier and S. F. Hayes (1984)

"Variation in a major surface protein of Lyme disease spirochetes."

Infect Immun 45 (1): 94-100.

Barbour, A. G. and S. F. Hayes (1986)

"Biology of *Borrelia* species."

Microbiol Rev 50 (4): 381-400.

Bärfverstedt, B. (1943)

"Über Lymphadenosis benigna cutis. Eine klinische und pathologisch-anatomische Studie."

Acta Derm Venerol (Stockh) 23 1-202

Benach, J., Bosler, E.M., Hanrahan, J.P., Voleman, J.L., Habicht, G.S., Bast, T.F., Cameron, D.J.,

Ziegler, J.L., Barbour, A.G., Burgdorfer, W., Edelman, R., Kaslow, R.A. (1983)

"Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease"

N. Engl. J. Med. 308: 740-742

Berg, D., K. G. Abson and N. S. Prose (1991)

Literaturverzeichnis

"The laboratory diagnosis of Lyme disease."

Arch Dermatol 127 (6): 866-70.

Berger, B.W., Johnson, R.C., Kodner, C., Coleman, L., (1992)

"Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from Erythema Migrans Lesions and Perilesional Skin"

J. Clin. Microbiol. 30: 359-361

Berglund, J., R. Eitrem, K. Ornstein, A. Lindberg, A. Ringer, H. Elmrud, M. Carlsson, A. Runehagen, C. Svanborg and R. Norrby (1995)

"An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden."

N Engl J Med 333 (20): 1319-27.

Brettschneider, S., H. Bruckbauer, N. Klugbauer and H. Hofmann (1998)

"Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis."

J Clin Microbiol 36; (9): 2658-65.

Buchwald, A. (1883)

"Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie"

Arch Derm Syph 15: 553-556.

Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P. (1982)

"Lyme disease - A tick-borne spirochetosis?"

Science 216: 1317-1319

Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, O. Peter and A. Aeschlimann (1983)

"Erythema chronicum migrans-a tickborne spirochetosis"

Acta Trop 40 (1): 79-83.

Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Benach, J.L. (1988)

"Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid tick vectors"

Ann NY Acad Sci 539: 172-179

Burgdorfer, W., Anderson, J.F., Gern, L., Lane, R.S., Piesman, J., Spielman, A., (1991)

"Relationship of *Borrelia burgdorferi* to its arthropod vectors"

Scan. J. Infect. Dis. Suppl 77: 35-40

Canica, M. M., F. Nato, L. du Merle, J. C. Mazie, G. Baranton and D. Postic (1993)

"Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis."

Scand J Infect Dis 25 (4): 441-8.

Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White and C. M. Fraser (2000)

"A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*."

Mol Microbiol 35 (3): 490-516.

CDC (1994)

"Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD): Lyme disease Workgroup Recommendations " Dearborn.

Christen, H. J., F. Hanefeld, H. Eiffert and R. Thomssen (1993)

"Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis."

Acta Paediatr Suppl 386: 1-75.

De Silva, A., Telford III., S.R., Brunet, L.R., Barthold, S.W., Fikrig, E., (1996)

"*Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine"

J. Exp. Med. 183: 271-275

Dinerman, H. and A. C. Steere (1992)

"Lyme disease associated with fibromyalgia."

Ann Intern Med 117 (4): 281-5.

Ditton, H.J., Neuss, M. and Zöller, L. (1992)

“Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical.”

FEMS Microbiol 217-230

Duray, P.H., (1989)

“Clinical Pathologic Correlations of Lyme Disease”

Rev. Infect. Dis. 11, Suppl. 6: S1487-S1493

EUCALB, E. C. A. o. L. B. (1998)

"EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis.)"

Zentralblatt für Bakteriologie 288 (30): 173-276.

Fallon, B.A., Keilp, J.G., Corbera, K.M., Petkova, E., Britton, C.B., Dwyer, E., Slavov, I., Cheng, J., Dobkin, J., Nelson, D.R., Sackeim, H.A. (2008)

“A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy.”

Neurology, 70(13): p. 992-1003.

Feder, H.M., Jr., Abeles, M., Bernstein, M., Whitaker-Worth, D., Grant-Kels, J.M. (2006)

“Diagnosis, treatment, and prognosis of erythema migrans and Lyme arthritis.”

Clin Dermatol. 24(6): p. 509-20.

Fingerle, V. and B. Wilske (2005)

"Abschlußbericht zur im Jahr 2004 durchgeführten Studie “Epidemiologische Aspekte zeckenübertragener Erkrankungen in Bayern: Lyme-Borreliose.”

Abschlußbericht Gesundheitsinitiative: Bayern aktiv.

Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C.

Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith and J. C. Venter (1997)

"Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*."
Nature 390 (6660): 580-6.

Frossard, E., Rutti, B., Burgherr, J., Godfroid, E., Brossard, M., Gerber, N.J. (1999)

"Detection of *Borrelia* DNA in synovial fluid for diagnosis of Lyme arthritis."
Schweiz Med Wochenschr., 129(26): p. 979-84.

Goettner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V. (2005)

"Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues."
J Clin Microbiol, 43(8): p. 3602-9.

Halperin, J. J., B. W. Little, P. K. Coyle and R. J. Dattwyler (1987)

"Lyme disease: cause of a treatable peripheral neuropathy."
Neurology 37 (11): 1700-6.

Halperin, J., Luft, B.J., Volkman, D.J., Dattwyler, R.J. (1990)

"Lyme neuroborreliosis. Peripheral nervous system manifestations."
Brain 113: 1207–1221

Hammers-Berggren, S., Lebech A., Karlsson, M., Svenungsson, B., Hansen, K., Stiernstedt, G. (1994)

Serological follow-up after treatment of patients with erythema migrans and neuroborreliosis.
J Clin Microbiol. 32(6): 1519-25.

Hassler D, Zöllner L, Haude M, Hufnagel HD, Sonntag HG. (1992)

"Lyme-Borreliose in einem europäischen Endemiegebiet."
Dtsch med Wschr.;117:767-774.

Hauser, U., G. Lehnert, R. Lobentanzer and B. Wilske (1997)

"Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato."

J Clin Microbiol 35 (6): 1433-44.

Heikkilä, T. Seppälä, I., Saxen, H., Panelius, J., Yrjänäinen, H., Lahdenne, P. (2002)

"Species-Specific Serodiagnosis of Lyme Arthritis and Neuroborreliosis due to *Borrelia* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. Garinii* by using Decorin Binding Protein A."

J Clin Microbiol. (40):453-460

Hengge, U.R., Tannapfel, A., Tying, S.K., Erbel, R., Arendt, G., Ruzicka, T. (2003)

"Lyme borreliosis."

Lancet Infect Dis, 2003. 3(8): p. 489-500.

Herxheimer, K. and K. Hartmann (1902)

"Über acrodermatitis chronica atrophicans."

Arch Dermatol Syph 61: 57-76 & 255-300.

Herzer, P. and B. Wilske (1986)

"Lyme arthritis in Germany."

Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 263 (1-2): 268-74.

Herzer, P. (1988)

"Lyme arthritis in Europe: comparisons with reports from North America."

Ann Rheum Dis 47 (9): 789-90.

Herzer, P. (1991)

"[The disease spectrum of *Borrelia burgdorferi* (Lyme Borreliosis)]."

Verh Dtsch Ges Inn Med 97: 202-10.

Hofmann, H. (1991)

Literaturverzeichnis

“Die Borrelia burgdorferi Infektion der Haut. Untersuchungen zum Krankheitsspektrum, zur Labordiagnostik und zur Verbreitung der Infektion im Saarland.“

Saarbrücken, medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes.

Hofmann, H. (2016)

"Kutane Lyme Borreliose“.

AWMF-Register Nr. 013/044 Klasse: S2k

Hofmann, H. (2009)

“Kutane Manifestationen der Lyme Borreliose“

Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, Arbeitsgemeinschaft für Dermatologische Infektiologie

Hopf HC. (1975)

“Peripheral neuropathy in acrodermatitis chronica atrophicans (Herxheimer).“

J Neurol Neurosurg Psychiatry; 38: 452–458

Hovmark A, Ansbrink E, Olsson I (1986)

“The spirochetal etiology of lymphadenosis benigna cutis solitaria.”

Acta Derm Venereol 66: 479-84

Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA (1999)

“Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany.”

Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 18: 697–703.

Huppertz, H.I., (2001)

“Lyme disease in children.”

Curr Opin Rheumatol., 13(5): p. 434-40.

Kaplan, R.F., Trevino, R.P., Johnson, G.M., Levy, L., Dornbush, R., Hu, L.T., Evans, J., Weinstein, A., Schmid, C.H., Klempner, M.S. (2003)

“Cognitive function in post-treatment Lyme disease: do additional antibiotics help?”

Neurology, 60(12): p. 1916-22.

Literaturverzeichnis

Karlsson, M., K. Hovind-Hougen, B. Svenungsson and G. Stiernstedt (1990)

"Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis."

J Clin Microbiol 28 (3): 473-9.

Kelly, R., (1971)

"Cultivation of *Borrelia hermsii*"

Science 173: 443-444

Krause, A. and P. Herzer, (2005)

"Early diagnosis of Lyme arthritis"

Z Rheumatol,. 64(8): p. 531-7

Kristoferitsch W, Sluga E, Graf M, Partsch H, Neumann R, Stanek G, Budka H (1998)

"Neuropathy associated with acrodermatitis chronica atrophicans. Clinical and morphological features"

Ann NY Acad Sci 539: 35-45

Kristoferitsch, W. (1991)

"Neurological manifestations of Lyme borreliosis."

Infection 19 (4): 268-72

Krupp, L.B., Hyman, L.G., Grimson, R., Coyle, P.K., Melville, P., Ahn, S., Dattwyler, R., Chandler, B. (2003)

"Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): a randomized double masked clinical trial."

Neurology, 60(12): p. 1923-30.

Kuiper, H., van Dam A.P., Spanjaard, L., de Jongh, B.M., Widjojokusomo, A., Ramselaar, T.C.P., Cairo, I., Vos, K., Dankert, J., (1994)

"Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Biopsy Specimen Taken from Healthy-Looking Skin of

Patients with Lyme Borreliosis"

J. Clin. Microbiol. 32: 715-720

Kurtenbach, K., Dizij, A., Voet, P., Hauser, P., Simon, M.M., (1997)

“Vaccination of natural reservoir hosts with recombinant lipidated OspA induces a transmissionblocking immunity against Lyme disease spirochaetes associated with high levels of LA-2 equivalent antibodies”

Vaccine 15 (15): 1670-1674

Lange R, Schneider T. (1993)

„Vektorbiologische und infektionsimmunologische Aspekte der durch Zecken übertragenen Lyme-Borreliose.“

Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin, Band 32, Dunker&Humblot, Berlin.

Lencakova, D., Fingerle, V., Stefancíková, A., Schulte-Spechtel, U., Petko, B., Schréter, I., Wilske, B. (2008)

“Evaluation of recombinant line immunoblot for detection of Lyme disease in Slovakia: comparison with two other immunoassays.”

Vector Borne Zoonotic Dis., 8(3): p. 381-90.

Liang, F., Steere, A., Marques, A., Johnson, B., Miller, J., Philipp, M. (1999)

"Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE."

J Clin Microbiol., 37(12): 3990-6.

Lipschütz, B. (1913)

"Über eine seltenen Erythemform (Erythema chronicum migrans)."

Arch Dermatol Syph 118: 349-356.

Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. (1999)

“Successful treatment of Lyme encephalopathy with intravenous ceftriaxone.”

J Infect Dis; 180: 377–383

Lünemann, J.D., Zarmas, S., Priem, S., Franz, J., Zschenderlein, R., Aberer, E., Klein, R., Schouls, L., Burmester, G.R., Krause, A. (2001)

Literaturverzeichnis

“Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis.”

J Clin Microbiol., 39(3): p. 1130-3

Lünemann, J.D. and A. Krause (2004)

„Heterogenität von *Borrelia burgdorferi*: Ätiopathogenetische Relevanz und klinische Implikation.“

Zeitschrift für Rheumatologie, 2003. 62(2): p. 148-54

Mitchell, P.D., Reed, K.R., Vandermause, M.F., Melski, J.W., (1993)

“Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Skin Biopsy Specimens of Patients with Erythema Migrans”

Clin. Microbiol. Infect. Dis. 99: 104-107

Mogilyansky, E., Loa, C., Adelson M., Mordechai E., Tilton R., (2004)

„Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease.”

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11(5): 924-9

Mullegger, R.R. (2004)

“Dermatological manifestations of Lyme borreliosis.”

Eur J Dermatol, 2004. 14(5): p. 296-309.

Nadelman, R. B. and G. P. Wormser (1998)

"Lyme borreliosis."

Lancet 352 (9127): 557-65.

Nau, R., Christen, H. J., Eiffert, H. (2009)

“Lyme Borreliose --- aktueller Kenntnisstand.“

Dtsch Arztebl Int 106 72---81

Oschmann, P. and P. Kraiczy (1998)

“Borreliose und Frühsommermeningoenzephalitis”

Bremen, UNI-MED Verlag.

Panelius, J., Lahdenne, P., Saxén, H., Carlsson, SA., Heikkilä, T., Peltomaa, M., Lauhio, A., Seppälä, I. (2003)

„Diagnosis of Lyme neuroborreliosis with antibodies to recombinant proteins DbpA, BBK32, and OspC, and VlsE IR6 peptide.“

J Neurol. 2003 Nov; 250(11):1318-27.

Pavia, C.S., (2003)

“Current and novel therapies for Lyme disease.”

Expert Opin Investig Drugs, 2003. 12(6): p. 1003-16.

Petersen, L. R., A. H. Sweeney, P. J. Checko, L. A. Magnarelli, P. A. Mshar, R. A. Gunn and J. L. Hadler (1989)

"Epidemiological and clinical features of 1,149 persons with Lyme disease identified by laboratory-based surveillance in Connecticut."

Yale J Biol Med 62 (3): 253-62.

Pfister, H.W. and T.A. Rupprecht, (2006)

“Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients.”

Int J Med Microbiol,. 296 Suppl 40: p. 11-6.

Picken, R.N., Strle, F., Picken, M.M., Ruzic-Sabljić, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Cimperman, J. (1998)

“Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions.”

J. Invest. Dermatol. 110(3): p. 211-4.

Piesman, J., Mather, T.N., Sinsky, J., Spielman, A., (1987)

“Duration of Tick Attachment and *Borrelia burgdorferi* Transmission”

J. Clin. Microbiol. 31: 1251-1255

Preac-Mursic, V., Wilske, B., Schierz, B., Pfister, H.W., Einhäupl, K.M., (1984)

“Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis”

Bannwarth

Eur. J. Clin. Microbiol 3: 564-565

Reimer B, Marschang A, Fingerle V, Wilske B, v. Sonnenburg F. (1999)

Prävalenz und Inzidenz der Lyme-Borreliose in Süd-und Ostbayern.

In: Abstracts of the Symposium Gentianum, Wildbad Kreuth, 22.-23.1.

Reimer, R., Erbas, B., Lobbischler, K., Truckenbrodt, R., Gartner-Kothe, U., Kapeller, N., Hansen, M., Fingerle, V., Wilske, B., v. Sonnenburg, F., (2002)

“Seroprevalence of Borrelia infection in occupational tick-exposed people in Bavaria (Germany)”

Int. J. Med. Microbiol. 291, Suppl. 33: 215

Ribeiro, J., (1987)

“Ixodes dammini: salivary anti-complement activity”

Exp. Parasitol. 70: 347-353

Ribeiro, J., Makoul, G.T., Livine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., (1985)

“Antihemostatis, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini”

J. Exp. Med. 161: 332-344

Ribeiro, J., Weis, J.J., Telford III., S.R., (1990)

“Saliva of the tick Ixodes dammini inhibits neutrophil function”

Exp. Parasitol. 70: 382-388

Richter, D., D. B. Schlee, R. Allgower and F. R. Matuschka (2004)

“Relationships of a novel Lyme disease spirochete, Borrelia spielmani sp. nov., with its hosts in Central Europe.”

Appl Environ Microbiol 70 (11): 6414-9.

Schaarschmidt, D., Oehme, R., Kimmig, P., Hesch, R.D., Englisch, S. (2001)

“Detection and molecular typing of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks and in different patient samples from southwest Germany.”

Eur J Epidemiol., 17(12): p. 1067-74.

Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J., Wilske, B. (2003)

"Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis."

J Clin Microbiol, 41(3): p. 1299-303.

Schulze, T. L., G. S. Bowen, E. M. Bosler, M. F. Lakat, W. E. Parkin, R. Altman, B. G. Ormiston and J. K. Shisler (1984)

"*Amblyomma americanum*: a potential vector of Lyme disease in New Jersey."

Science 224 (4649): 601-3.

Schwartz, I., G. P. Wormser, J. J. Schwartz, D. Cooper, P. Weissensee, A. Gazumyan, E. Zimmermann, N. S. Goldberg, S. Bittker, G. L. Campbell and C. S. Pavia (1992)

"Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions."

J Clin Microbiol 30 (12): 3082-8.

Schwartz, I., Bittker, S., Bowen, S.L., Cooper, D., Pavia, C., Wormser, G.P., (1993)

"Polymerase Chain Reaction Amplification of Culture Supernatants for Rapid Detection of *Borrelia burgdorferi*"

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12: 879-882

Schwarzenbach, R., D. Djawari (1999)

"Multiple Erythemata migrantia bei Borreliose im Stadium 2"

Monatsschr Kinderheilkd 147: 751-753.

Seltzer, E.G., Gerber, M.A., Cartter, M.L., Freudigman, K., Shapiro, E.D. (2000)

"Long-term outcomes of persons with Lyme disease."

JAMA, 283(5): p. 609-16.

Sigal, L.H., Zahradnik, J.M., Lavin, P., Patella, S.J., Bryant, G., Haselby, R.,

Hilton, E., Kunkel, M., Adler-Klein, D., Doherty, T., Evans, J., Malawista, S.E., and The Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium, (1998)

“A Vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer- surface protein A to prevent

Lyme disease“

N. Engl. J. Med. 339 (4): 216-222

Simon, M.M., Bauer, Y., Zhong, W., Hofmann, H., Wallich, R., (1999)

“Lyme disease: pathogenesis and vaccine development”

Zentralbl. Bakteriол. 289 (5-7): 690-5

Singh, S.K., H.J. Girschick (2004)

“Lyme borreliosis: from infection to autoimmunity.”

Clin Microbiol Infect. 10(7): p. 598-614.

Sivak, S., Agüero-Rosenfeld, M., Nowakowski, J., Nadelman, R., Wormser G., (1996)

“Accuracy of IgM immunoblotting to confirm the clinical diagnosis of early Lyme disease.”

Arch Intern Med. 156 (18): 2105-9.

Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, E.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M., (1977)

“Lyme arthritis: An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut

Communities”

Arthritis Rheum. 20: 7-17

Steere, A.C., Malawista, S.E., Bartenhagen, N.H., Spieler, P.N., Newman, J.H., Rahn, D.W.,

Hutchinson, G.J., Green, J., Snyderman, D.R., Taylor, E., (1984a)

“The Clinical Spectrum and Treatment of Lyme Disease”

Yale J. Biol. Med. 57: 453-461

Steere, A.C., Grodzicki, R.L., Craft, J.E., Shrestha, M., Komblatt, A.N., Malawista S.E., (1984b)

“Recovery of Lyme Disease Spirochetes from Patients”

Yale J. Biol. Med. 57: 557-560

Steere, A. C., E. Dwyer and R. Winchester (1990)

"Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles."

N Engl J Med 323 (4): 219-23.

Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T., Noxakaoxsko, J.,

Schmid, C.H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D.S., and the Lyme Disease

Steere, A.C., Sikand, V.K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R.T., Nowakowski, J., Schmid, C.H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D.S. (1998)

“Vaccination against Lyme Disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant“

N. Engl. J. Med. 339 (4): 209-215

Steere, A.C. (2000)

„*Borrelia Burgdorferi* (Lyme Disease, Lyme Borreliosis).“

In Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Edited by GL Mandell, JE Bennett, R Dolin. Philadelphia, Churchill Livingstone, pp 2504-2518

Steere, A.C. (2001)

”Lyme disease.”

N Engl J Med,. 345(2): p. 115-25.

Stoenner, H.G., Dodd, T., Larsen, C., (1982)

“Antigenic variation of *Borrelia hermsii*”

J. Exp. Med. 156: 1297-1311

Strle, F., Cheng, Y., Nelson, J.A., Picken, M.M., Bouseman, J.K., Picken, R.N. (1995)

“Infection rate of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in Slovenia.”

Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 14(11): p. 994-1001.

Svartz, N., (1946)

“Penicillinbehandlung vid dermatitis atrophicans Herxheimer”

Nord. Med. 32: 2783

von Baehr, R., (2009)

“Grundlagen zur Lyme Borreliose.“

Umwelt Medizin Gesellschaft, 22(2): p. 99-103.

Wallich, R., Kramer, M.D., Simon, M.M., (1996)

“The Recombinant Outer Surface Protein A (lipOspA) of *Borrelia burgdorferi*: A Lyme Disease Vaccine”

Infect. 24 (5): 396-397

Wang, G., A. P. van Dam, A. Le Fleche, D. Postic, O. Peter, G. Baranton, R. de Boer, L. Spanjaard and J. Dankert (1997)

"Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19)."

Int J Syst Bacteriol 47 (4): 926-32.

Wang, G., A. P. van Dam, I. Schwartz and J. Dankert (1999)

"Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications."

Clin Microbiol Rev 12 (4): 633-53.

Wang, G., G. P. Wormser and I. Schwartz (2001)

Borrelia burgdorferi. Molecular medical microbiology.

Sussman, M. London, Academic Press: 2059–2092.

Wienecke, R., Koch, O.M., Neubert, U., Göbel, U., Volkenandt, M., (1993)

“Detection of Subtype-Specific Nucleotide Sequence Differences in a *Borrelia burgdorferi* Specific Gene Segment by Analysis of Conformational Polymorphism of cRNA Molecules”

Med. Microbiol. Lett. 2: 239-246

Wilske, B., V. Preac-Mursic, G. Schierz, R. Kuhbeck, A. G. Barbour and M. Kramer (1988)

"Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*."

Ann N Y Acad Sci 539: 126-43.

Wilske, B., G. Schierz, V. Preac-Mursic, H.-W. Pfister, K. Weber, K. v Busch and A. Baruschke (1989)

"IgM and IgG immune response to *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and neuroborreliosis."

Zentralbl Bakteriol 18: 290-298.

Wilske, B., V. Preac-Mursic, V. Fuchs and G. Schierz (1990)

"Diagnostik der Lyme-Borreliose."

Diagnose & Labor 40: 24-36.

Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Gobel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab and G. Zumstein (1993)

"An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis."

J Clin Microbiol 31 (2): 340-50.

Wilske, B., L. Zöller, V. Brade, H. Eiffert, U. B. Göbel, G. Stanek and H. W. Pfister (2000).

"Lyme Borreliosis: Quality Standards for the Microbiological Diagnosis of Infectious Diseases."

Mauch, H., Lütticken, R. and Gatermann, S. München Jena Medical lectorate, Urban & Fischer Verlag

Wilske, B. and V. Fingerle (2005)

„Lyme Borreliose Diagnostik. Der Mikrobiologe“

2005. 15. Jahrgang: p. 209-220.

Wormser, G.P., Dattwyler, R.J., Shapiro, E.D., Halperin, J.J., Steere, A.C., Klempner, M.S., Krause, P.J., Bakken, J.S., Strle, F., Stanek, G., Bockenstedt,

L., Fish, D., Dumler, J.S., Nadelman, R.B. (2006)

"The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America."

Clin Infect Dis. 43(9): p. 1089-134.

Zore, A., Ruzić-Sabljić, E., Maraspin, V., Cimperman, J., Lotric-Furlan, S., Pikelj, A., Jurca, T., Logar, M., Strle, F. (2002)

"Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans."

Wien Klin Wochenschr., 114(13-14): p. 606-9.

Zöller, L., Burkard, S., Schäfer, H. (1991)

"Validity of western immunoblot band patterns in the serodiagnosis of Lyme borreliosis."

J. Clin. Microbiol. 29 (1) 174-182.

Zumstein, G. (1993)

"An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis."

J Clin Microbiol 31 (2): 340-50.

8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Univ. Prof. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann für ihre exzellente Betreuung, die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und ihr Vertrauen in mir von Anfang an. Vielen Dank für die inspirierende Begeisterung und die Unterstützung an jedem Punkt der Arbeit.

Besonderen Dank auch an Herrn Univ. Prof. Dr. med. T. Biedermann für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotionsarbeit an seiner Klinik.

Danke an Frau Prof. Dr. med. Heide Lore Hofmann für die Hilfestellung und alle Denkansätze.

Ein ganz besonderes Dankeschön an Frau Dr. Antonia Todorova für die begleitende Unterstützung, wertvollen Anregungen und Ratschläge während der gesamten Zeit.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Stefanie Gilles-Stein und Frau Ulrike Rothenhäusler für die ausgezeichnete Hilfestellung und Assistenz während meiner praktischen und theoretischen Arbeit im Labor.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls und Instituts für Umweltmedizin, UNIKA-T, und der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein.

Danke an Dich, diese Arbeit hätte ohne Dich nicht stattgefunden.

Widmen möchte ich die Arbeit meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer im Leben unterstützt haben und mir dies alles ermöglicht haben. Ohne diese Menschen hätte so viel Gutes nicht stattgefunden.