

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie der
Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Etablierung und Evaluierung zweier IgG Subklassen - ELISA für die Borreliose - Diagnostik beim Menschen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht von
Silke Zebandt

Gießen 2001

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie der
Justus - Liebig - Universität Gießen
Betreuer: Priv. Doz. Dr. P. Oschmann

Eingereicht über das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus - Liebig - Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch : Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Etablierung und Evaluierung zweier IgG Subklassen - ELISA für die Borreliose - Diagnostik beim Menschen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Eingereicht von
Silke Zebandt
Tierärztin aus Remscheid

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter:

Priv. Doz. Dr. P. Oschmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der mündlichen Prüfung : 13.06.2001

Meiner Familie, meinem Freund Falk Sittner,
und meiner Freundin Andrea Baldus

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Medizinhistorischer Überblick	3
2.2 Ätiologie der Lyme-Borreliose	4
2.3 Epidemiologie	5
2.4 Syndrome der Lyme-Borreliose des Menschen	7
2.4.1 Erythema migrans	7
2.4.2 Lymphadenosis cutis benigna	8
2.4.3 Akrodermatitis chronica atrophicans	8
2.4.4 Neuroborreliose	9
2.4.5 Lyme-Arthritis	10
2.5 Struktur und Funktion der IgG-Subklassen	11
2.6 Bedeutung der IgG-Subklassen bei verschiedenen Erkrankungen	13
2.7 Immunreaktionen bei Infektionen mit <i>Borrelia burgdorferi</i>	15
2.8 Diagnostische Möglichkeiten	18
2.8.1 Kultureller Erregernachweis	18
2.8.2 Westernblot	19
2.8.3 Indirekter Immunfluoreszenztest	20
2.8.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay	20
2.9 Probleme der serologischen Diagnostik	20
3. Material und Methoden	23
3.1 Probanden	23
3.1.1 Definition der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik	25
3.1.2 Definition der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik	27
3.1.3 Definition der seronegativen Probandengruppe	28

3.2 Erregerspezifische Labordiagnostik	29
3.2.1 Westernblot	29
3.2.2 IgG (gesamt) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	29
3.3 IgG1- bzw. IgG3-ELISA	30
3.4 Erstellung eines Auswertungssystems für die IgG1- und IgG3-ELISA	32
3.5 Statistische Auswertung	33
4. Ergebnisse	36
4.1 Demographische Kennzeichen der Probandengruppen	36
4.2 Qualitätsparameter der neuen IgG1- und IgG3-ELISA	36
4.2.1 Intra-Assay-Präzision und Inter-Assay-Präzision	36
4.2.2 Verdünnungsechtheit	39
4.2.3 Untere Nachweisgrenzen der IgG1- und IgG3-ELISA	40
4.3 Korrelation zwischen den spezifischen IgG1- bzw. IgG3-Titern	42
4.4 Validität der IgG1- und IgG3 - ELISA zur Identifizierung seropositiver Probanden	43
4.5 Bestimmung des IgG3/IgG1-Quotienten (Q IgG3/IgG1) bei Probanden mit erhöhten Antikörpertitern gegen <i>B.burgdorferi</i>	45
4.6 Bestimmung eines geeigneten Q IgG3/IgG1-Cut-Off zur Differenzierung von Probanden mit erhöhten Antikörpertitern gegen <i>B.burgdorferi</i>	48
4.7 Validität des Q IgG3/IgG1-Cut-Off zur Identifizierung von Probanden mit LB - Symptomatik unter seropositiven Probanden	49
4.8 Serologische Verlaufskontrollen bei Neuroborreliosepatienten	51
4.9 Validität des Testsystems bei Verwendung von anderen Borrelienantigenen	53
5. Diskussion	61
5.1 Diskussion der Probandenrekrutierung	61
5.2 Diskussion der Methoden der serologischen Voruntersuchungen	62
5.3 Pathogenetische Hintergründe der beobachteten serologischen Phänomene	65

5.4 Diskussion der Ergebnisse	66
5.5 Anwendungsmöglichkeiten des neuen diagnostischen Verfahrens	70
6. Zusammenfassung	71
7. Summary	72
8. Literaturverzeichnis	74
9. Anhang	87
9.1 Abkürzungsverzeichnis	87
9.2 Reagenzien bei der Entwicklung der IgG1- und IgG3-ELISA	89
9.3 Statistische Auswertungen der Probandendaten	90

1. Einleitung

Die Infektion mit der Spirochäte *Borrelia burgdorferi* führt in der Regel zu einer entzündlichen Erkrankung einzelner oder mehrerer Organsysteme, die in einigen Fällen auch chronisch verlaufen kann. Es existieren bei der Lyme-Borreliose nur wenige Krankheitsbilder, wie z.B. das Erythema migrans (EM), die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) oder das Bannwarth-Syndrom, die durch eine klare klinische Symptomatik eindeutig als Manifestation einer *B. burgdorferi*-Infektion diagnostizierbar sind. Daneben kann die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* aber mit vielen klinisch nicht eindeutig zu diagnostizierenden Krankheitsbildern [119], wie z.B. einer Arthritis kleinerer Gelenke [160], einer Fibromyalgie [31] oder einer Karditis [156] einher gehen. Dadurch ist die alleinige klinische Diagnosestellung einer Lyme-Borreliose nicht immer möglich. Durch die serologische Diagnostik erhält man bisher lediglich Hinweise darauf, ob der Patient Kontakt mit dem Erreger *B. burgdorferi* hatte oder nicht. Nach Untersuchungen von Wilske et al. [164], Atamer [5], Hassler [61] und Paul et al. [113] liegt die Seroprävalenz von *B. burgdorferi* in der normalen Bevölkerung bei 4,4% bis 40%, wodurch die Aussagefähigkeit positiv serologischer Befunde eingeschränkt ist. Darüber hinaus ist in einer Studie von Fahrer et al. [37] nachgewiesen worden, daß eine Serokonversion auch ohne Krankheitsanzeichen, also asymptomatisch, ablaufen kann. Daher muß bei positiven serologischen Befunden erst geklärt werden, ob sie Folge einer klinisch manifesten Infektion sind oder Zeichen einer möglichen asymptomatischen Serokonversion sind, oder serologische Narben einer ausgeheilten Lyme-Borreliose darstellen ([170],[67],[64]). Bei der Diagnosestellung „Lyme-Borreliose“ sollten deshalb klinische Symptomatik und Serologie kombiniert werden [51]. Dabei leisten die bisherigen kommerziell erhältlichen Testverfahren nur insofern eine Hilfestellung, als sie das Vorhandensein von Antikörpern gegen die Spirochäte *B. burgdorferi* detektieren können. Mit diesen serologischen Testverfahren ist aber bis jetzt keine Aussage über das Vorliegen einer klinisch manifesten *B. burgdorferi*-Infektion möglich [23]. Verschiedene Ansätze, wie man Hinweise auf die klinisch manifeste Infektion bekommen kann, existieren in der Literatur schon: Schutzer et al. [139] untersuchten in einer Studie die Möglichkeit Immunkomplexe als Zeichen einer bestehenden *B. burgdorferi*-Infektion zu nutzen. Dabei fanden sie zwar in den frühen Phasen der Borrelieninfektion vermehrt Immunkomplexe, bei Syndromen der Stadien II und III konnten sie aber keine Verbesserung zu den herkömmlichen Testsystemen feststellen. Als serologischer Indikator für eine bestehende, klinisch manifeste *B.b.*-Infektion für die Borrelienserologie kam auch ein

Aviditätstest in Frage. Ein von Rauer et al. [125] durchgeführter Aviditätstest erbrachte jedoch keine Verbesserung in der serologischen Differenzierung von seropositiven Probanden mit und ohne LB-Symptomatik. Dabei wurden Lyme-Borreliose-Patienten auf hoch avide Antikörper untersucht und es konnten lediglich bei EM-Patienten, bei denen die Diagnostik jedoch schon klar anhand der Klinik zu stellen ist, Unterschiede zu der Kontrollgruppe gefunden werden.

Diese Problematik veranlaßte zur Untersuchung folgender Fragestellungen:

1. Ist ein zu entwickelndes Testsystem fähig seropositive und seronegative Probandengruppen voneinander zu trennen?
2. Ist es durch die Bestimmung von IgG3/IgG1-Verhältnissen möglich, zu entscheiden, ob Lyme-Borreliose verdächtige Symptome bei seropositiven Probanden, tatsächlich auf einer aktuellen Infektion mit *B. burgdorferi* beruhen oder nicht ?
3. Ist diese Differenzierung auch mit Mikrotiterplatten, die mit Antigenen unterschiedlicher *B. burgdorferi* - Genospezies beschichtet sind, möglich ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde auf Basis von vorab festgelegten Kriterien ein großes Patientenkollektiv zusammengestellt. Durch die Entwicklung borrelienspezifischer IgG1- bzw. IgG3-ELISA wurde dann versucht, eventuelle Unterschiede der IgG3/IgG1-Verhältnisse bei seropositiven Probanden mit und ohne LB-Symptomatik zu detektieren und damit einen serologischen Indikator für die Borreliendiagnostik zu etablieren. Dabei wurden die neu entwickelten ELISA auch auf ihre Leistungsfähigkeit und Spezifität geprüft.

2. Schrifttum

2.1 Medizinhistorische Entwicklung des Begriffes der Lyme-Borreliose

Die Entdeckungsgeschichte der Lyme-Borreliose beginnt im Jahre 1909, als der Dermatologe Arvid Afzelius [2] erstmals von einer sich ringförmig ausbreitenden Hautveränderung nach einem Zeckenstich berichtet. Die Hypothese, daß das von ihm benannte Erythema chronicum migrans (heute: Erythema migrans, EM) durch Insektenstiche bzw. -bisse verursacht wird, erhielt durch Lipschütz [88] eine neue Bestätigung. Dieser veröffentlichte 1923 eine Übersichtsdarstellung von 16 beobachteten EM - Fällen. Er erwähnte zwar vorausgegangene Zecken - oder Insektenstiche bei insgesamt elf Patienten, sah aber keinen Zusammenhang zu einer Allgemeinerkrankung oder einer Beteiligung anderer Organsysteme. Garin und Bujadoux [44] stellten 1922 den Zusammenhang zwischen Zeckenstich, EM und neurologischen Symptomen zur Diskussion. Das Krankheitsbild zeichnete sich dabei durch eine Meningitis mit begleitenden radikulären Ausfällen aus. Sie prägten die Bezeichnung "paralyse par les tiques". Die gleiche Erkrankung wurde 1944 von Bannwarth [6] ausführlich charakterisiert. Dieser wies in zahlreichen Fallserien auf den akuten und chronischen Multisystemcharakter dieser Erkrankung hin und beschrieb den Befall des Nervensystems unter

dem Bild einer Meningoenzephaloradikulomyelitis. Obwohl zum damaligen Zeitpunkt Arboviren als übertragenes Agens von vielen Untersuchern vermutet wurden, deuteten erst die 20 Jahre später von Schaltenbrand [136] in mehreren Fallbeschreibungen geäußerten Therapieerfolge mit Penicillin darauf hin, daß ein Bakterium die Erkrankung verursacht. Mitte der siebziger Jahre traten in den USA, speziell in den Gemeinden Old Lyme, Lyme und East Haddam in Connecticut bisher unbekannte Arthritiden auf. Die Arbeitsgruppe um Steere [145] leitete eine epidemiologische Studie ein und sie kam zu dem Ergebnis, daß die Häufigkeit der bisher dem Formenkreis der juvenilen rheumatoiden Arthritis zugeordneten Erkrankungsfälle in Lyme und Umgebung etwa 100 mal höher war, als der Landesdurchschnitt. Diese überdurchschnittliche Häufung legte die Vermutung eines infektiösen Agens nahe. Bei der intensiven anamnestischen Befragung der Patienten gaben etwa 25% der Patienten an, einige Wochen zuvor ein Erythem gehabt zu haben. Die endgültige Entdeckung des Erregers gelang Burgdorfer 1982 [19] nach Isolierung einer bis dahin nicht klassifizierten Spirochäte aus dem Mitteldarm von *Ixodes dammini*. Mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenstestes [92] wies er im Serum von Patienten mit Lyme-

Arthritiden Antikörper nach, die spezifisch mit der gefundenen Spirochäte reagierten. Nachdem die Arbeitsgruppe um W. Burgdorfer die wichtigsten Schritte in der Charakterisierung des Bakteriums durchgeführt hatte, wurde es nach dem Erstbeschreiber *Borrelia burgdorferi* benannt. Somit konnte, ausgehend von epidemiologischen Befunden in der Gemeinde Lyme, die der Erkrankung den Namen gab, innerhalb weniger Jahre die Ätiologie dieser Infektionskrankheit geklärt werden. Auch in Europa wurde die Spirochätenätiologie nicht nur bestätigt, sondern es konnten darüber hinaus weitere Krankheitsmanifestationen als zum Syndromkomplex der Lyme Krankheit gehörig identifiziert werden. Dies war die Acrodermatitis chronica atrophicans, eine diffuse, idiopathische Hautatrophie, die bereits 1883 von Buchwald beschrieben wurde und die Lymphadenosis cutis benigna, die schon Bäverstedt 1943 beschrieben hatte. Darüber hinaus wurden auch bestimmte Formen zirkumskripter Sklerodermie und Lichen sclerosus et atrophicus sowie die chronische Neuroborreliose, die als Enzephalomyelitis in Erscheinung tritt, mit dem Lyme Komplex in Zusammenhang gebracht.

2.2 Ätiologie der Lyme-Borreliose

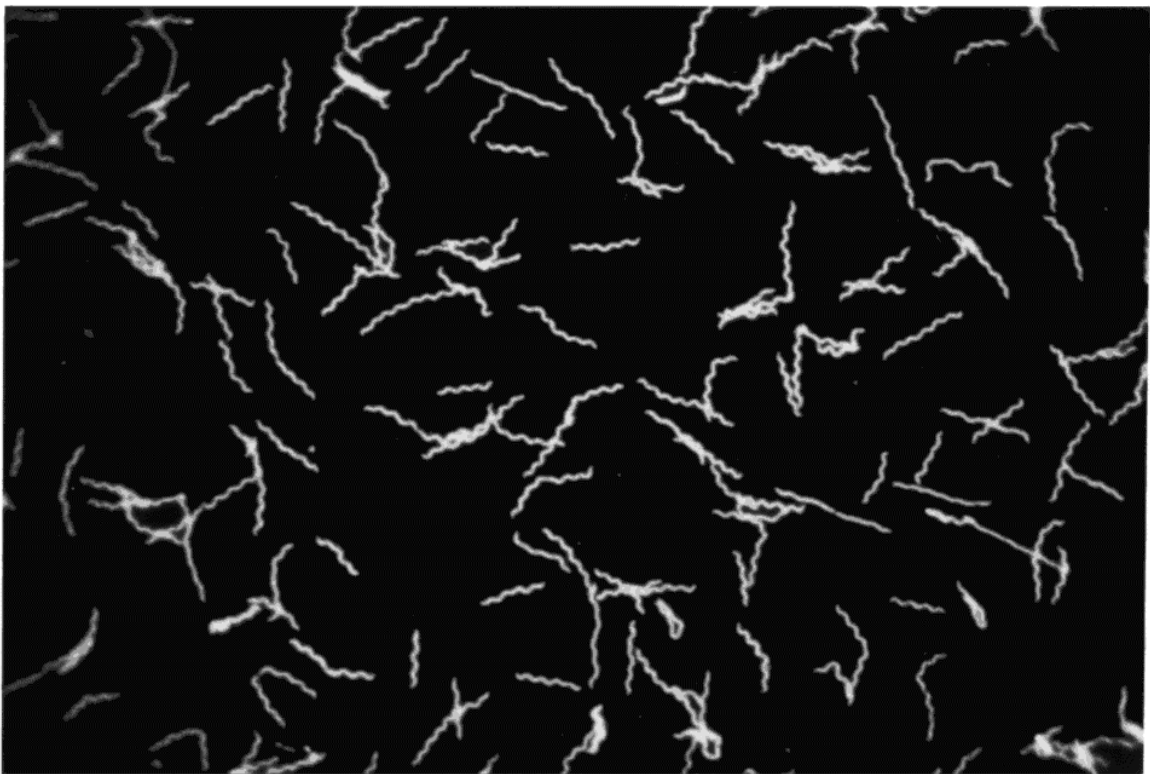


Abb.1: Kultivierte *B. burgdorferi* sensu stricto (Genospezies B31) im dunkelfeldmikroskopischen Bild

Taxonomisch gehört *Borrelia burgdorferi* sensu lato zur Familie *Spirochaetaceae* [137] in der Ordnung der *Spirochaetales* zu denen auch die Gattung *Treponema* und *Leptospira* gehören. Bei *B. burgdorferi* handelt es sich um ein gram-negatives, spiralig geformtes Bakterium mit einer Länge von 4-30 µm bei einem Durchmesser von 0,18-0,25 µm [129]. Der Zelleib ist unregelmäßig gewunden und in der Mitte von einem Achsenfilament durchzogen, das sich aus vier bis elf Einzelfilamenten zusammensetzt. Durch Rotation der Filamente kann der gesamte Zellkörper in eine rotatorische Bewegung versetzt werden. Borrelien sind dabei sowohl in ihrer Längsachse, als auch seitlich biegsam. Die Generationszeit beträgt unter optimalen Bedingungen der Kultur zwischen sieben und zwanzig Stunden.

Das Genom besteht vermutlich aus einem linearen Chromosom mit 853 Genen und elf variablen linearen und zirkulären Plasmiden mit vermutlich weiteren 430 Genen [71]. Die Plasmide exprimieren die drei wichtigsten Oberflächenproteine OspA, OspB und OspC [68]. Dabei ist das OspA-Protein in Europa sehr heterogen: es wurden sieben verschiedene Serotypen beschrieben, die eng mit der genetischen Speziesklassifikation korrelieren, während in den USA bisher nur ein Serotyp OspA gefunden worden ist [168]. Es treten bei den Borrelien Rekombinationen in den linearen Plasmiden auf. Borrelien unterliegen daher einer stetigen Genvariation [124]; die auch als langsamer genetischer Drift von Generation zu Generation zu bezeichnen ist [8]. Bei chronischen Borrelieninfektionen konnte gezeigt werden, daß es z.T. zu einem Verlust von Plasmiden bei den Genospezies kommen kann [116]. Dies konnte in Labortieren bei Passageversuchen bestätigt werden [46].

Als Erreger der Lyme-Borreliose sind bisher zehn Genospezies bekannt [159], von denen drei für den Menschen als pathogen angesprochen werden können. Dies sind die Genospezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s. Abb.1), *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* [167]. Die Genospezies *Borrelia japonica* und *Borrelia andersonii* werden als für den Menschen apathogen angesehen. Die Genotypen *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi* und *Borrelia bissetii* sp. nov. [159] konnten bis jetzt lediglich isoliert werden.

2.3 Epidemiologie

Die Borrelieninfektion tritt mit einem deutlichen Schwerpunkt in der nördlichen Hemisphäre weltweit auf. In Europa und Nordamerika stellt die Lyme-Borreliose die häufigste durch Zecken übertragene Zoonose dar [119]. Allein in Deutschland beträgt die jährliche Rate von Neuerkrankungen etwa 0,5% der Bevölkerung [61].

Borrelia burgdorferi sensu lato tritt in den verschiedenen Regionen als drei unterschiedliche Genospezies, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. garinii*, auf. In Europa treten alle drei Spezies nebeneinander auf, wobei *B.afzelii* nur hier auftritt, in Nordamerika ist vornehmlich *B. burgdorferi* sensu stricto verbreitet und in Asien existiert hauptsächlich *B. garinii* [101].

Durch eine mögliche variable Expression von Oberflächenmolekülen entsteht bei jeder Spezies eine Vielzahl von Serotypen [165], so daß auf engstem geographischen Raum auch verschiedene Geno - und Serotypen nebeneinander vorkommen können. Auch Mischinfektionen mit verschiedenen Genospezies sind beschrieben.

Als Vektoren der Borrelien dienen in Europa und Asien *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* sowie in den USA *Ixodes dammini*, *Ixodes pacificus* und *Ixodes scapularis* [101]. Etwa 20% aller Nymphen sind in Deutschland infiziert [61]. In den USA variiert die Infektionsrate zwischen 3% in nicht Endemiegebieten und bis zu 65 % in den Endemiegebieten in adulten Zecken [101]. Das Bakterium gelangt beim Saugakt mit dem Blut von einem kompetenten Wirt in den Vektor Zecke. Es verbleibt dann in dem Verdauungstrakt der Zecken oder wandert über die Hämolymphe in die Speicheldrüse und andere Zeckenorgane, insbesondere auch in die Ovarien der Weibchen. Damit wird auch eine transovarielle Übertragung auf die Nachkommenschaft des betroffenen Zeckenweibchen möglich. Die Rückübertragung auf einen Wirt erfolgt während einer der nächsten Blutmahlzeiten entweder durch Reurgitation aus dem Verdauungstrakt oder durch Einbringen des infizierten Zeckenspeichels in die Blutbahn des Wirtes. Reservoirwirt der Borrelien ist in Nordeuropa das Rehwild, ansonsten stellen Kleinnager, insbesondere Mäuse und Hasen, das Erregerreservoir dar [101]. Aber auch Vögel können ein Reservoir für Borrelien sein [8].

Anders als bei der endemisch auftretenden FSME-Infektion können in Europa keine entsprechenden Endemiegebiete bzw. Naturherde Borrelien-infizierter Zecken abgegrenzt werden. In den USA tritt die Borrelieninfektion z.T. endemisch auf, v.a. in den nordöstlichen Teilen des Landes, im mittleren Westen und an der Westküste [22].

Das jahreszeitliche Auftreten der Borreliose ist an die Zeckenaktivität und das Freizeitverhalten der Bevölkerung gekoppelt. Die Frühstadien der Erkrankung (EM) treten daher hauptsächlich in den Monaten März - November in Erscheinung, während die übrigen Krankheitsbilder (ACA, Neuroborreliose, Arthritis) nicht immer einen eindeutigen saisonalen Gipfel erkennen lassen [66].

Die Übertragungsrate von Borrelien bezogen auf alle Zecken beträgt zwar nur 2,6% , bei Berücksichtigung allein der borrelienhaltigen Zecken steigt die Rate jedoch auf 26,7% [93]. Nach einem Zeckenstich reagieren 2,6%-5,6% der Betroffenen mit einer Serokonversion und 0,3-1,4% mit einer manifesten Erkrankung [75]. Das durchschnittliche Alter der Patienten liegt bei 44 Jahren, wobei Männer häufiger erkranken als Frauen. Die Angaben der Seroprävalenz und Inzidenz schwanken in Abhängigkeit der geographischen Lage und der verschiedenen Patientengruppen erheblich zwischen 3-5% bei der Normalbevölkerung in den USA und Holland ([22],[82]) und der Risikogruppe (Waldarbeiter, Waldläufer) mit bis zu 47% in Italien [25].

2.4 Syndrome der Lyme-Borreliose des Menschen

Beschrieben werden von Steere et al. [144] drei Stadien der Lyme-Borreliose, die nacheinander oder auch unabhängig voneinander auftreten können [169]. Meist findet man zuerst eine lokale Infektion als Hautreaktion (Stadium I). Diese heilt in aller Regel spontan wieder ab. Wenn die Spirochäten von dem lokalen Infektionsort über die Blutbahn in andere Organe gelangen, können sie dort innerhalb von Wochen Krankheitssymptome auslösen. Dies wird als akute Organmanifestation (Stadium II) beschrieben. Nach Monaten oder Jahren ist dann trotz eines vorübergehenden Abklingens der Symptome mit dem Auftreten neuer Krankheitssymptome zu rechnen - auch chronische Organmanifestation (Stadium III) genannt [109].

Bei der Lyme-Borreliose unterscheidet man verschiedene Manifestationen der Erkrankung. Die Organsysteme, die hauptsächlich betroffen sind, sind die Haut, das Nervensystem und die Gelenke. Andere Organsysteme, wie z.B. die Augen ([98], [86]) oder das Herz [129], können in seltenen Fällen ebenfalls betroffen werden. Bei der Hautmanifestation der Lyme-Borreliose unterscheidet man die drei Symptomkomplexe, das Erythema migrans (EM), die Lymphadenosis cutis benigna (LCB) und die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA).

2.4.1 Erythema migrans

Das EM gilt heute als charakteristische Hautmanifestation des Frühstadiums einer Borrelieninfektion (Stadium I) [102]. Es kann in jedem Lebensalter wenige Tage bis Wochen nach einem Zeckenstich auftreten [118]. Zunächst bildet sich ein homogenes, rötlich gefärbtes Erythem bis zu einer Größe von ca. 5 cm. Im Verlauf von Wochen und Monaten blaßt das Erythem häufig zentral ganz oder teilweise ab [129] und bleibt auf einen zentrifugal fortschreitenden, hellrötlichen 0,5-2 cm breiten, bogig verlaufenden Randsaum beschränkt. Im Zentrum verbleibt meist eine Rötung oder ein lymphozytäres Knötchen. Nach Wochen bis zu einem Jahr kann das EM spontan ausheilen, was aber nicht mit einer Elimination des Erregers einher geht. Die Diagnose wird in der Regel anhand des klinischen Bildes oder mit Hilfe einer Hautbiopsie gestellt, aus welcher der Erreger kulturell oder mittels PCR nachgewiesen werden kann.

2.4.2 Lymphadenosis cutis benigna

Seltener tritt als erste Hautmanifestation die Lymphadenosis cutis benigna (LCB) auf. Dabei handelt es sich um livid - rötliche polsterartige Schwellungen oder Knoten, denen lymphoretikuläre Zellproliferationen in der Kutis und / oder Subkutis zugrunde liegen [109]. Weiche, gut durchblutete Gewebspartien, wie z.B. Ohrläppchen, Brustwarzen oder Skrotalhaut sind die bevorzugten Lokalisationen für ein LCB [101]. Der Durchmesser der Veränderung kann zwischen 0,5 und 5 cm variieren. Nicht selten findet sich auch eine regionale Lymphknotenschwellung. Besonders Kinder neigen zur Entwicklung einer LCB. Auch hier wird die Diagnose aufgrund der klinischen Symptome gestellt. Unterstützend kann die Diagnose durch eine Histologie gesichert werden [109].

2.4.3 Acrodermatitis chronica atrophicans

Die Acrodermatitis chronica atrophicans wird heute allgemein als Manifestation des Spätstadiums (Stadium III) einer Borrelieninfektion aufgefaßt. Der Zeitpunkt des Auftretens der Symptome nach einem Zeckenstich kann individuell variieren; in der Regel dauert es mehrere Jahre, bis die schleichenden Veränderungen durch einen Arzt diagnostiziert werden. Die ACA beginnt gewöhnlich mit fleckigen Erythemen oder polsterartigen, teigig - weichen, livid - rötlich verfärbten, unscharf begrenzten Schwellungen an den Extremitätenstreckseiten [109]. Die ACA schreitet dann unter zunehmender Hautverdünnung zu einem atrophischen Endstadium fort [66]. Letzteres kann begleitet oder gefolgt sein von reparativen Vorgängen,

wie z.B. Dermatosklerosen oder fibroiden Knoten. Die ACA kann aber auch mit fleckigen, netzförmigen oder streifigen Erythemen in anderen Extremitätenbereichen, nur selten allerdings an Rumpf - oder Kopfhaut, beginnen. Die bei längerem Bestehen zunehmende Atrophie des dermalen und epidermalen Gewebes äußert sich klinisch in einer zigarettenpapierartigen Verdünnung und Runzelung der Oberhaut [161], verbunden mit einem verstärkten Hervortreten der darunter gelegenen, erweiterten Blutgefäße. Häufig greift die ACA bei längerem Bestehen auf die kontralaterale Extremität über, gelegentlich sind alle vier Gliedmaßen betroffen.

Bei der Diagnose der ACA sollte man sich nicht allein auf das klinische Bild verlassen, sondern mindestens den histologischen Befund einer Hautbiopsie unterstützend heranziehen. Gleichzeitig kann man hohe borrelienspezifische IgG-Titer nachweisen [66].

2.4.4 Neuroborreliose

B. burgdorferi verursacht im Nervensystem eine Vielzahl von Störungen. Sie können als Begleitsymptomatik eines EM oder ACA auftreten oder auch als alleiniges Symptombild im Stadium der disseminierten (Stadium II) oder persistierenden (Stadium III) Infektion in Erscheinung treten.

In dem ersten Stadium einer Borrelieninfektion finden sich meist noch keine neurologischen Ausfälle. Nicht selten wird jedoch über heftige Kopfschmerzen oder Myalgien geklagt.

Im Stadium II einer Borrelieninfektion tritt zum einen, bei Kindern häufiger als bei Erwachsenen, eine Meningitis ohne neurologische Ausfälle auf. Sie ist durch fluktuierende Kopfschmerzen, leichte Nackensteifigkeit, Lichtempfindlichkeit, Übelkeit und Erbrechen gekennzeichnet [74]. Zum anderen tritt im Stadium II die nach Garin und Bujadoux [43] benannte Meningoradikuloneuritis als neurologische Störung auf. Sie stellt die in Europa häufigste Organmanifestation einer *B. burgdorferi* - Infektion dar ([111],[117]). Die Symptome entwickeln sich zwischen 4-6 Wochen nach einem Zeckenstich oder einem EM. Fast alle Betroffenen leiden zunächst unter nächtlich betonten, sehr quälenden brennenden, ziehenden oder reißenden Schmerzen, häufig begleitet von Mißempfindungen. Die Schmerzen können sich attacken - oder wellenförmig steigern. Sie führen zu erheblichen Schlafstörungen. Der Schmerz beginnt meist in der Gegend des Zeckenstiches, er breitet sich von hier häufig aus. Eine Zuordnung der Schmerzen zu bestimmten peripheren Nerven oder Wurzeln gelingt in der Regel nicht. Kurze Zeit nach Auftreten der Schmerzen stellen sich bei ca. 90% der Patienten neurologische Ausfälle ein. Dabei überwiegen motorische gegenüber sensiblen

Störungen. Bei zwei Dritteln der Patienten entwickeln sich auch Ausfälle der Hirnnerven. Hier kommt es meist zu einer Parese des Nervus facialis [74]. Jeder zweite Patient leidet zudem unter Lähmungen an den Gliedmaßen. Meist entspricht die Verteilung der Ausfälle der einer Oligoradikulitis oder polytopen asymmetrischen Polyradikulitis. Diagnostisch ist neben der Klinik auch die Untersuchung des Liquor cerebrospinalis unumgänglich. Hier findet sich nahezu immer eine lymphoplasmazelluläre Pleozytose mit vielen Plasmazellen und aktivierten Lymphozyten ([120],[154]). Es besteht zudem meist eine Blut-Liquor-Schrankenstörung mit einer Eiweißkonzentration bis etwa 4 g/l. Es können in der Regel eine intrathekale Immunglobulinsynthese (IgG und IgM) und oligoklonale Immunglobulinbanden nachgewiesen werden [73]. Wird eine Nervenbiopsie durchgeführt, so lassen sich vaskulitische Läsionen mit perivaskulären lymphoplasmazellulären Infiltrationen der epi-, peri-, und manchmal endoneuralen Gefäße und ein Verlust der markhaltigen Nervenfasern darstellen.

B. burgdorferi verursacht sowohl akute wie auch chronische, leichte bis schwere Enzephalitiden, die dem Stadium III nach Steere zugeordnet werden.

Bei der akuten, mitunter lebensbedrohenden Enzephalitis treten Allgemeinsymptome wie Fieber, Tachykardie, Mattigkeit und Kopfschmerzen auf. Oft bestehen psychische Auffälligkeiten wie Bewußtseinstörung, Verwirrtheit, Antriebsarmut, emotionale Labilität oder Aggressivität. Die neurologische Untersuchung zeigt bei diesen Patienten Herdsymptome wie eine Hemi-, Tetra-, oder Paraparese, Hemianopsie, Aphasie, Apraxie, Dysarthrie, Dysphagie und andere bulbäre Symptome sowie Tremor, hirnorganische Anfälle, Optikusneuritis, Doppelbilder, zerebelläre Ataxie und Blasenstörungen. Chronische Krankheitsverläufe können zu Persönlichkeitsstörungen und dementiellen Bildern führen. Auch im Stadium III der Neuroborreliose weisen die Patienten eine Pleozytose und Gesamteiweißerhöhung im Liquor cerebrospinalis auf. Regelmäßig kann auch eine spezifische intrathekale Antikörperbildung mit den dafür typischen oligoklonalen Banden gefunden werden. Die Diagnose wird hier wie bei der Neuroborreliose des Stadiums II gestellt.

2.4.5 Lyme-Arthritis

Die Lyme-Arthritis ist in den USA die häufigste Organmanifestation der Lyme-Borreliose; in Europa tritt sie in 10-15% der Erkrankungen auf [29]. Dabei zeigt sich bei der Lyme-Arthritis am häufigsten das klinische Bild rezidivierender Monarthritiden der großen Gelenke, wie

Knie - oder Sprunggelenk [94]. Im Gegensatz zur primär chronischen Polyarthritiden sind nur selten mehr als drei Gelenke gleichzeitig befallen. Es gibt aber keine Gelenke, die nicht befallen sein können. Die klinischen Beschwerden der Lyme-Arthritis sind, je nachdem ob sie akut oder chronisch auftreten, dem zweiten oder dritten Stadium der Lyme-Borreliose zuzuordnen. Die Erkrankung kann zwar selbstlimitierend sein; meist verläuft sie jedoch rezidivierend über Monate bis Jahre [94].

Das morphologische Substrat der Gelenkentzündung ist die Synovia, in der histologisch Borrelien sichtbar gemacht werden können. Ferner können röntgenologisch Knochenerosionen, Knochenzysten, periartikuläre Verkalkungen und Verknöcherungen des Bindegewebes und der Sehnen nachgewiesen werden [66]. Die Diagnose ist klinisch aber aufgrund der unspezifischen Symptomatik und der großen Zahl von Differentialdiagnosen sehr schwer zu stellen. Mit Hilfe der Serologie können in diesem Krankheitsstadium hohe erregerspezifische Immunglobulinkonzentrationen nachgewiesen werden. Im Gelenkpunktat kann die Erreger-DNA mittels PCR in 85% der Fälle nachgewiesen werden [102]. Der Behandlungserfolg einer Antibiotikatherapie hängt von der Erkrankungsdauer und den Vorbehandlungen vor Therapiebeginn ab, weshalb der Früherkennung eine wichtige Bedeutung zukommt [66].

2.5 Struktur und Funktion der IgG-Subklassen

Immunglobuline sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 180.000 Dalton, die aus zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehen. Die Analyse der IgG-Immunglobuline des Menschen hat gezeigt, daß die beiden schweren Ketten des Immunglobulins in vier strukturell verschiedenen Formen vorkommen. Diese strukturellen Unterschiede in den Immunglobulinen bedingen auch unterschiedliche Funktionen; daher hat man diese unterschiedlichen Formen als IgG-Subklassen definiert. Beim Menschen sind die vier Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 bekannt (s. Tab. 1). Die einzelnen Subklassen können mittels spezifischer Antiseren, die bestimmte Epitope im Fc-Anteil eines Immunglobulins erkennen, unterschieden werden. Der Anteil der verschiedenen IgG-Subklassen an der Immunantwort ist u.a. von der Struktur, der Löslichkeit und der Konzentration des Antigens, dem Ort seiner Verabreichung, seiner Verweildauer, der Existenz von Gedächtniszellen sowie genetischer Faktoren abhängig [79].

Die Subklasse IgG1 stellt mit 60,3 - 71,5% den größten Anteil der IgG-Antikörper im menschlichen Körper. Diese Subklasse wird bei Antigenkontakt früh gebildet und dominiert

bei einer Anti-Protein-Immunantwort [53]. Antikörper dieser Subklasse können das Komplementsystem auf dem klassischen Weg aktivieren und sie wirken zytophil auf Mono-, Neutro-, Lympho- und Thrombozyten. Damit spielen sie eine entscheidene Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Zudem sind bei einer allergischen Reaktion und zu Beginn einer Hyposensibilisierungsbehandlung überwiegend IgG1-Antikörper im Blut zu finden [141].

Tabelle 1: Unterschiede der biologischen Eigenschaften von IgG-Subklassen aus Roitt [132] und Keller [79]

Biologische Eigenschaften	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Vol. % am Gesamt - IgG im Normalserum	65	23	8	4
Halbwertszeit (Tage)	21	20	7	21
Membranpassage	+	(+)	+	+
Komplementaktivierung (C1 - Weg)	+++	++	++++	+/-
Bindung an Monozyten	+++	+	+++	+/-
Blockiert IgE-Bildung	-	-	-	+
Antikörperdominanz	Anti - Rh	Anti - Dextran	Anti -Rh	Anti -Faktor VIII

Antikörper der Subklasse IgG2 stellen den zweitgrößten Anteil der zirkulierenden Antikörper dar (23%). Sie können ebenfalls Komplement auf dem klassischen Weg aktivieren, wenn auch schwächer als IgG1 und IgG3. Antikörper dieser Subklasse sind vor allem gegen Polysaccharide gerichtet ([53], [132]).

IgG3- und IgG4- Antikörper werden beim Menschen in geringem Umfang gebildet [149]. Der Anteil der IgG 3 - Antikörper an der Gesamtmenge des IgG im Normalserum beträgt nach der Untersuchung von French et al. [42] 5,0 bis 8,4 Vol.%. Der IgG3-Antikörper besitzt eine größere Masse als die anderen Subklassen. Dies liegt darin begründet, daß die „hinge region“, das Verbindungsstück zwischen Fc-Stück und den leichten Ketten, länger ist als bei den anderen drei IgG-Subklassen [53]. Durch diesen Unterschied in der Struktur wird die stärkere Aktivierbarkeit des Komplementsystems durch IgG3-Antikörper erklärt [40]. IgG3 ist der stärkste Aktivator des Komplementsystems gefolgt von IgG1 [163]. Damit spielen die IgG3-Antikörper eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Die Halbwertszeit von IgG3-Antikörpern ist mit sieben Tagen deutlich kürzer als bei den anderen

Subklassen [72]. IgG3-Antikörper besitzen wie auch die IgG1-Antikörper zytophile Wirkung auf Monozyten, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Lymphozyten. Die Spezifität der IgG3-Antikörper, die auf Proteine bezogen ist, entspricht der von IgG1-Antikörpern.

IgG4-Antikörper stellen mit 4% den kleinsten Anteil der IgG-Subklassen dar. Sie werden vor allem bei langandauernder Antigenstimulation [96] und im Verlauf einer Hyposensibilisierungstherapie vorgefunden ([155],[115]). Die IgG4-Subklasse ist in ihrer Funktion eng mit IgE verknüpft. Zum einen hat Sondergaard et al. [141] einen gemeinsamen Regulationsmechanismus für die Bildung von IgG4 und IgE gefunden, zum anderen belegen andere Studien von Yamakoshi [171] und Peng et al. [115], daß IgG4 an der IgE vermittelten Histaminfreisetzung beteiligt ist.

Meist lassen sich bei Immunreaktionen nur wenige IgG4-Antikörper nachweisen [55]. Jedoch stellen sie bei bestimmten Infektionen, wie z.B. durch *Helicobacter spp.* [172] oder Pneumokokken [7] den größten Anteil der IgG-Subklassen dar. Dies scheint vor allem bei langandauernder Auseinandersetzung mit dem Erreger der Fall zu sein ([80], [91], [1]).

2.6 Bedeutung der IgG-Subklassen bei verschiedenen Erkrankungen

Die Betrachtung der Subklassenverteilung innerhalb der spezifischen humoralen Immunreaktion als möglichen diagnostischen Parameter zur serologischen Verifizierung eines klinischen Lyme-Borreliose-Verdacht erscheint aufgrund zahlreicher Studien, die im Verlaufe einer Immunreaktion bei anderen Infektionen bestimmte IgG-Subklassenverteilungen in Abhängigkeit von der Infektionsdauer gefunden hatten, sehr erfolgsversprechend. Bei diesen Studien zeigten sich den Autoren unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Dominanzen der einzelnen IgG-Subklassen.

Es fanden sich Kodominanzen an spezifischen Antikörpern zweier IgG-Subklassen, genauso wie Dominanzen von einzelnen IgG-Subklassen. Es wurden je nach Immunantwort auf eine Infektion Kodominanzen der IgG2- und IgG4-Subklassen gefunden ([142], [21],[100],[162]). Bei vielen bakteriellen Infektionen wurde eine vermehrte Präsenz der Subklassen IgG1 und IgG3 gefunden [55]. Aber auch bei viralen Erkrankungen, wie der Infektion mit Cytomegalieviren, Epstein-Barr-Viren oder FSME dominierten diese beiden Subklassen ([87], [158], [65]).

Mehrere Studien fanden bei den unterschiedlichsten Infektionen jedoch vorwiegend eine Dominanz einer der IgG-Subklassen.

Da sehr viele Arbeitsgruppen die IgG-Subklassenverhältnisse bei den verschiedensten Infektionen untersucht haben, wird in diesem Rahmen nur auf diejenigen eingegangen, die eine Dominanz der IgG1- oder IgG3-Subklasse, die auch bei einer *B. burgdorferi*-Infektion dominieren, fanden. Autoren wiesen IgG1-Dominanzen bei bakteriell bedingten Erkrankungen nach: Von Robin et al. [131] z.B. wurden die IgG-Subklassenverhältnisse bei Infektionen mit zwei verschiedenen *Shigella* Genospezies bei Männern zwischen 18 und 22 Jahren untersucht. Dabei fanden sie eine Dominanz der IgG1-Subklasse bei einer Infektion mit *Shigella sonnei* und eine IgG2-Dominanz bei einer Infektion mit *Shigella flexneri*. Hammarström et al. [55] berichtet in seiner Zusammenfassung über IgG-Subklassen in bakteriellen Erkrankungen, daß Proteinantigene hauptsächlich eine IgG1 dominierte Immunantwort induzieren. Dabei wurde diese Dominanz auch bei viralen Infektionen gefunden: Sundquist et al. [151] beobachteten bei Patienten mit *Varizella* eine IgG1-Dominanz und bei Patienten mit *Zoster* eine reine IgG3-Dominanz. In einer Studie von Torgano et al. [153] stellte sich heraus, daß IgG1- produzierende B-Zellen bei Patienten mit chronischer viraler Hepatitis häufiger zu finden sind, als bei gesunden Probanden. Diese Beobachtung interpretiert der Autor dahingehend, daß eine Erhöhung der IgG1 - Konzentration durch eine Aktivierung der Immunglobulinproduktion durch Antigene verursacht sein könnte. Die Dominanz der IgG1-Subklasse konnte aber auch bei Infektionen durch Parasiten gefunden werden: Salimonou et al. [135] z.B. fanden bei Patienten mit akuter Malaria erhöhte Konzentrationen an spezifischen IgG1-Antikörpern, während alle anderen Subklassen gegenüber der Konzentration im symptomfreien Intervall deutlich abnahmen. Auch die Studie von Paz et al. [114] untersuchte die IgG-Subklassenverteilung bei mit dem Leberegel *Fasciola hepatica* reinfizierten Mäusen in Abhängigkeit der Zeit der Neuinfektion. Dabei fanden sie bei einer Reinfektion nach vier Wochen einen signifikanten Anstieg von IgG1. Bei einer Reinfektion mit *Fasciola hepatica* nach elf Wochen fanden Paz et al. [114] eine Dominanz der IgG2-Subklasse. Aber auch z.B. bei Hyposensibilisierungen mit verschiedenen Allergenen von Sondergaard et al. [141] wurde am Anfang der Behandlung ein Anstieg der spezifischen IgG1-Antikörperkonzentration und erst später eine Zunahme der IgG4-Antikörperkonzentration beobachtet.

Andere Autoren fanden eine Dominanz der IgG3-Subklasse gegenüber der IgG1-Subklasse: Auch hier wurde die Dominanz sowohl bei bakteriellen als auch bei viralen Erkrankungen gefunden: Hammarström et al. [55] berichtet in seiner Zusammenfassung über IgG-

Subklassen in bakteriellen Erkrankungen weiter, daß Polysaccharidantigene hauptsächlich eine IgG3

dominierte Immunantwort induzieren. Morell et al. [100] untersuchten Seren von Patienten, die zuvor über 2 Jahre oder länger unter einer Hepatitis B Erkrankung litten. Dabei beobachteten sie, daß die IgG-Antikörper gegen die Hepatitis B Virusoberfläche auf die Subklassen IgG1 und IgG3 beschränkt sind und daß mehr IgG3-Antikörper als IgG1-Antikörper nachweisbar sind. Grauballe et al. [49] untersuchte bei Infektionen mit Rotaviren die IgG-Subklassen Antwort im Verlauf der Erkrankung. Er wies zuerst IgG3-Antikörper nach; IgG1-Antikörper waren in dieser Studie erst nach 2 Monaten nachweisbar. Die Dominanz der IgG3-Subklasse konnte aber auch bei anderen z.T. degenerativen Erkrankungen gefunden werden: bei der Untersuchung von Patienten mit Miller Fisher Syndrom (MFS) und Guillain-Barré-Syndrom Patienten von Schwerer et al. [140] zeigte sich IgG3 als die dominante IgG-Subklasse bei den untersuchten Infektionen. Martini et al. [95] fanden in einer Studie mit 26 Patienten, die an einer juvenilen chronischen Arthritis (JCA) litten im Vergleich zu 164 gesunden Kindern einen Anstieg der Serumkonzentrationen der IgG1-, IgG2- und IgG3-Subklassen. Dabei war der Anstieg der IgG3 - Subklasse am stärksten.

Neben Querschnittsuntersuchungen zu den Dominanzverhältnissen der IgG-Subklassen, bei denen keine Aussage über eventuelle Unterschiede der Dominanzen der IgG-Subklassen im Laufe eines Infektionsgeschehen gemacht werden können, untersuchten in der Literatur auch mehrere Autoren diese Thematik im Verlaufe einer Infektion. Dabei konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Erkrankung und der unterschiedlichen Dominanzen einzelner IgG Subklassen gezeigt werden. Bei diesen Untersuchungen fanden Autoren bei anderen Infektionen den Wechsel von einer IgG1-Dominanz zu Beginn einer Infektion zu einer IgG3-Dominanz zu späteren Infektionszeitpunkten. Junker et al. [72] z.B. untersuchte die Immunantwort gegen Vollvirusantigen von *Varizella Zoster* - Virus. Bei dieser Studie fiel auf, daß IgG1 - Antikörper zuerst im Verlauf der Infektion gebildet wurden, während IgG3-Antikörper erst später nachweisbar waren. Von Baughn et al. [13] wurde beobachtet, daß bei Patienten mit primärer Syphilis vor allem IgM- und IgG1-Antikörper entstanden, während bei einer aktiven sekundären Syphilis IgG1- und IgG3-Antikörper vorlagen. Coleman et al. [27] konnten im Serum von Patienten mit aktiver *Herpes simplex* Virus Infektion innerhalb von 21 Tagen nach der Infektion keine IgG3-Antikörper nachweisen, während spezifische IgG1-Antikörper in allen untersuchten Seren gefunden wurden. Auch Mathiesen et al. [96] beobachtete bei Patienten mit *Herpes simplex* -

Encephalitis als typische IgG-Subklassenantwort einen frühen Anstieg spezifischer IgG1-Antikörper im Gegensatz zu den IgG3-Antikörpern, die auch hier erst später detektiert wurden.

2.7 Immunreaktionen bei Infektionen mit *Borrelia burgdorferi*

Die Immunantwort bei einer Infektion des Menschen mit *B.b.* erfolgt, wie bei anderen Infektionen auch, nach einem bestimmten Muster [30]. In der ersten Phase der Immunantwort interagieren die Spirochäten mit ortsständigen Makrophagen und leiten dadurch eine starke Entzündungsreaktion ein. Dabei wandern polymorphkernige Granulozyten in das Infektionsareal ein, bleiben an den Wänden des Endothels haften und tragen im Zusammenspiel mit Sauerstoffradikalen, Stickstoffoxiden und sekundären Mediatoren zur Gewebsschädigung bei [109]. Darüber hinaus präsentieren die Makrophagen bestimmte Antigene der Borrelien auf ihrem MHCII-Molekül den T-Zellen [45]. Diese erkennen den MHC-Antigenkomplex der präsentierenden Zelle und stimulieren sodann durch membrangebundene Adhäsionsmoleküle beim Zell-zu-Zell Kontakt eine B-Zelle ([26],[104]). Die B-Zellen werden darüber hinaus durch Zytokine zur Vermehrung und Differenzierung zu Memory- und Plasma- Zellen angeregt. Die Plasmazellen produzieren dann wiederum Antikörper, wobei die Zytokine beeinflussen, welche Antikörperklasse oder Subklasse gebildet wird [112]. In den ersten 2-5 Wochen der Infektion überwiegt die IgM-AK-Synthese [119], der dann im Verlaufe des Infektionsgeschehens eine verstärkte IgG- und IgA-Immunglobulinproduktion folgt [28]. Bei einer Borrelieninfektion dominieren die IgG1- und IgG3-Subklassen ([62],[106]). Genauso wie z.B. bei einer *Treponema pallidum* - Infektion bleibt der IgG-Antikörperspiegel im Serum dann unabhängig von einer Therapie über Jahre konstant [30]. Dieser Verlauf der Immunantwort zeigte sich ebenfalls im Mausmodell. Frey und Rao [43] fanden in ihrer Studie eine verstärkte IgM und IgG Antikörperproduktion kurz nach der Infizierung mit *B.b.*, wobei die IgM-Antikörperkonzentration bis zur 6.- 8. Woche stieg, um dann allmählich wieder abzusinken. 2-3 Monaten nach der Infizierung mit *B. burgdorferi* werden nur noch IgG-Antikörper in zunehmenden Konzentrationen gebildet. In mehreren Studien [89] konnte im Tiermodell gezeigt werden, daß diese Immunantwort von der Genospezies des infizierenden Erregers abhängig ist. Golde et al. [46] beobachteten, daß bei einer Reinfektion mit zwei unterschiedlichen *B. burgdorferi* - Genospezies bei beiden Infektionen IgG- und IgM- Antikörper gebildet wurden. Diese reagierten jedoch unterschiedlich im Westernblot, d.h. sie richteten sich gegen unterschiedliche Epitope. Da

Antikörper z.T. genospeziesspezifisch sind und somit nicht vor einer Infektion mit einer anderen Genospezies schützen, ist die Reinfektion mit *Borrelia burgdorferi* bei Patienten die Eiffert et al. [35], sowie die Arbeitsgruppen um Pfister [118] und Rose [133] beschrieben, erklärlich.

Parallel zur Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen stimuliert eine Infektion mit Krankheitserregern immer auch die Differenzierung spezifischer T-Zellen. Die T-Zellen lassen sich nach ihren Oberflächenantigenen in CD4+- und CD8+- Zellen einteilen. Dabei ist es für den Verlauf einer Infektion von Bedeutung, welche Gruppe von T-Zellen aktiviert wird. Laut Busch [20] scheinen CD8+-Zellen, die zu einer direkten Zytolyse infizierter Zellen führen, eine protektive Wirkung bei einer Borrelieninfektion zu besitzen. Bei den Studienpatienten konnte gezeigt werden, daß borrelienspezifische CD8+-Zellen gebildet wurden, und daß diese zu einer stärkeren Lyse infizierter Zellen führte als bei Patienten, die keine spezifischen CD8+-Zellen aufwiesen.

Die CD4+-Zellen lassen sich in TH₀-Zellen, TH₁-Zellen und TH₂-Zellen unterteilen. Die TH₁-Zellen aktivieren das Komplementsystem und weiterhin, über die Synthese von TNF α , und TNF β , IFN γ und IL3 (s. Tab.2), die zelluläre Abwehr. Außerdem fördern die TH₁-Zellen die IL2-Ausschüttung und stimulieren darüber ihre eigene Synthese und hemmen die TH₂-Zellbildung. Die TH₂-Zellen sezernieren die Zytokine IL4, IL5 und IL6 (s. Tab.2) und aktivieren über diese die humorale Immunantwort. Durch die Ausschüttung von IL4 fördern TH₂-Zellen ihre eigenes Wachstum und hemmen die TH₁-Zellen, so daß sich TH₁- und TH₂-Zellen gegenseitig in ihrer Synthese beeinflussen. Durch die Synthese von Zytokinen beeinflussen TH₁- und TH₂-Zellen außerdem die Dominanzverhältnisse der IgG-Subklassen. IL4, welches von TH₂-Zellen gebildet wird, steigert die Produktion von IgG1 und hemmt die IgG3-Synthese. Das von TH₁-Zellen gebildete IFN γ hingegen fördert die IgG3 - und hemmt die IgG1-Synthese, so daß die Dominanz einer Subklasse von der Dominanz einer TH-Untergruppe abhängig ist. Dies konnte Radbruch [121] im Mausmodell bestätigen. Verabreichte man Mäusen bestimmte Zytokine ließ sich damit die Produktion bestimmter Antikörper-Subklassen unmittelbar beeinflussen.

Bei Patienten mit Borrelieninfektionen fanden Widhe et al. [162], Matyniak und Reiner [97] und Oksi et al. [105] eine Dominanz von TH₁-Zellen mit einer verstärkten IFN γ - und einer verminderten IL4-Synthese. Eine Anreicherung IFN γ -produzierender TH₁-Zellen konnte ebenfalls im Liquor von Patienten mit einer Neuroborreliose, sowie in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme-Arthritis in Studien von Yssel et al. [174] und Forsberg et al. [41]

gezeigt werden. Diese Beobachtungen konnten Keane-Myers und Nickell [78] und Barthold et al. [12] im Mausmodellen bestätigen. In ihren Versuchen entwickelten C3H-Mäuse, die für *B. burgdorferi* empfänglich sind, nach Infizierung mit *B. burgdorferi* eine schwere Arthritis, bildeten dabei verstärkt TH₁-Zellen und wiesen einen hohen IFN γ -Spiegel auf. BALB-Mäuse, die resistent sind, reagierten dagegen mit einer TH₂-Zellen-Dominanz und einer ausgeprägten IL4-Produktion. Auch Rao et al. [123] fanden in ihrer Studie eine protektive Wirkung gegen *B. burgdorferi* bei Mäusen, die bei einer Infektion vermehrt mit einer TH₂-Immunantwort reagierten. Diese Untersuchungen deuten daraufhin, daß die Symptomatik einer Infektion mit *B. burgdorferi* durch das Vorherrschen einer IgG-Subklasse beeinflusst wird, und lassen eine IgG3-Dominanz bei seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik bzw. eine IgG1-Dominanz bei seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik erwarten.

Tabelle 2: Zellen, die Zytokine bilden und die Rolle der Zytokine in der Antikörperantwort beim Menschen (nach Laman et Claasen [83])

Zytokin	Bildungszellen	fördert Bildung von	hemmt Bildung von
IL2	T,M,NK	-	IgG1 (Antagonist von IL4) IgE (Antagonist von IL4) Effekt unabhängig von IFN γ
IL3	NK, eo	-	-
IL4	T,M, eo, mast, NK	IgG1, IgE	IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM
IL5	mast, eo	-	-
IL6	B,M,NK	Plasmazellen	-
TNF α	T,B,M,NK	-	-
TNF β	T,B,M,NK	IgA, IgG2b	IgE
IFN γ	T,M,NK	IgG2a, IgG3 (Je nach Aktivator)	IgG1, IgG2b, IgG3 (Je nach Aktivator) IgE (Antagonist von IL4)

Legende: T:T-Zelle, B:B-Zelle, M:Makrophage, NK: Natürliche Killerzelle, mast:Mastzelle, eo: eosinophiler Granulozyt

2.8 Diagnostische Möglichkeiten

Bei der Diagnose der Lyme-Borreliose steht das klinische Bild im Vordergrund. Dabei werden die verschiedenen klassischen Syndrome der Erkrankung gesehen, aber auch eher untypische

Verläufe mit z.B. ophtalmologischen Veränderungen, interstitiellen Pneumonien, Hepatitis, Orchitis und fetalen Mißbildungen.

2.8.1 Kultureller Erregernachweis

Der klassische Infektionsnachweis wird in der Regel durch den kulturellen Nachweis des Erregers im Serum oder durch die Polymerase-Kettenreaktion geführt. Dies erweist sich bei dem Borreliennachweis im Vollblut (<1%) oder aus Gelenksynovia (2-5%) aber als wenig sensitiv und zudem sehr aufwendig. Im Liquor ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit (10-20%) eine Anzüchtung der Borrelien möglich; die Sensitivität ist aber auch hier gering. Aufgrund des präparativen Aufwandes und der diagnostischen Unsicherheit [67] bei negativem Ergebnis ist der kulturelle Nachweis der Borrelien für die Routinediagnostik ungeeignet ([148], [166],[24],[84]). Um aber Fragen der Epidemiologie oder der Zuordnung neuer Symptomkomplexe zu klären, ist die Isolation des Erregers aus z.B. Liquor und die Weiterzucht in vitro unerlässlich. Da der kulturell-bakteriologische Erregernachweis nur bedingt möglich ist, wird die klinische Verdachtsdiagnose in der Routinediagnostik durch den Nachweis spezifischer Antikörper gesichert [57]. Dabei werden Westernblots als qualitative, Immunfluoreszenztests (IFT) und Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) als quantitative Tests verwendet.

2.8.2 Westernblot

Der Westernblot ist eine serologische Methode, mit der Antikörper detektiert werden können, die gegen Partialantigene des Erregers gerichtet sind.

Dabei werden die molekularen Erregerbestandteile, v.a. Proteine (100,75,66,60,41,35,30, 21,18,15,12,5 kd), zuerst durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden dann durch elektrophoretischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zur Darstellung der Antigen-Antikörper Reaktion werden sie dann mit Patientenserum beschichtet. Wenn in dem Serum spezifische Antikörper vorhanden sind, so binden diese mit den entsprechenden Komponenten auf der Membran. Die gebundenen Antikörper können durch einen zweiten radioaktiv oder enzymatisch markierten Antikörper dargestellt und ausgewertet werden. Die Lage der Bande ermöglicht dabei eine genaue Identifizierung der antigenen Proteine. Daher ist dies eine qualitative Methode, Borrelienantikörper nachzuweisen. In der Borreliendiagnostik wird die Westernblot-Technik dann eingesetzt um eine lokale, erregerspezifische intrathekale IgG-

Antikörpersynthese nachzuweisen. Dieser Index wird als Vergleich von der Konzentration des IgG im Liquor cerebrospinalis zum gesamt Serum IgG dividiert durch die Serumalbumin Konzentration berechnet [152]. Werte $>0,7$ deuten auf eine intrathekale Antikörpersynthese hin. Diese Methode ist hoch sensitiv und für die Diagnose einer Neuroborreliose sehr aussagekräftig ([59], [166]). Als Screeningmethode in der Routinediagnostik ist der sehr aufwendige Westernblot als Screeningmethode aber nicht zu empfehlen [77].

2.8.3 Indirekter Immunfluoreszenztest

Bei dem indirekten Immunfluoreszenztest (IFT) handelt es sich um eine semiquantitative Methode. Dabei werden auf die mit Borrelien beschichteten Objektträger Patientenserum in einer festgesetzten Verdünnungsreihe aufgetropft. Sind in dem zu testenden Serum spezifische Antikörper vorhanden, so binden diese während einer Inkubationszeit an das korrespondierende Antigen. Da es sich bei den Antikörpern um Gammaglobuline handelt, kann durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten IgG- oder IgM - spezifischen Antihumanglobulins der Antigen - Antikörperkomplex sichtbar gemacht werden.

2.8.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Als Screeningmethode in der Borrelienserologie wird ein Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA), ein sogenannter Sandwich-ELISA, eingesetzt. Dabei ist eine Mikrotiterplatte mit spezifischen Antigenen beschichtet. Auf diese bringt man die zu untersuchende Probe Serum- oder Liquorprobe auf und inkubiert diese für eine bestimmte Zeit. Die in der Probe enthaltenen Antikörper reagieren spezifisch mit den Antigenen der Platte und werden auch bei dem nach der Inkubation durchgeführten Waschen nicht mehr gelöst. Danach bringt man ein Konjugat auf die Platte auf. Dies ist ein Anti-Antikörper an den das Enzym Meerrettichperoxidase gebunden ist, der wiederum spezifisch mit dem gebundenen Serumantikörper reagiert. Nach einer weiteren Inkubation und nochmaligem Waschen wird als Substrat ein Chromogen-Puffer-Komplex aufgebracht, das durch das an das Konjugat gekoppelte Enzym umgesetzt wird, wodurch eine Farbreaktion abläuft. Nach dem Abstoppen des Versuches mittels einer Stopplösung, wird dann die Farbintensität der Reaktionslösung photometrisch gemessen. Die optische Dichte ist ein Maß für den Gehalt an spezifischen Antikörpern der Probe.

2.9 Probleme der serologischen Diagnostik

Bei allen serologischen Nachweismethoden wird die diagnostische Aussagekraft beeinflusst durch das Infektionsstadium sowie die Qualität des serologischen Nachweisverfahrens.

Manche Epitope von *B. burgdorferi* kommen nicht nur bei dieser Bakterienart vor, sondern sind auch bei anderen Bakterien vorhanden ([18],[38]). Besonders starke serologische Kreuzreaktivität zeigten Seren von Patienten mit Syphilis, Leptospirose, Pinta, Frambösie und Rückfallfieber ([4],[28],[92],[134],[14]). Aber auch bei Autoimmunkrankheiten wurden Kreuzreaktivitäten mit *B. burgdorferi* gefunden [122]. Durch diese Kreuzreaktivität können falsch positive Ergebnisse in der Borrelienserologie auftreten.

Keines der kommerziellen serologischen Testsysteme kann derzeit eine ausreichend sichere Aussage darüber geben, ob verdächtige Symptome eines Patienten die Folge einer bestehenden Infektion mit *B.burgdorferi* sind oder nicht [23]. Verschärft wird dieses Problem der serologischen Detektion möglicher Symptome als Folge einer bestehenden *B.burgdorferi* - Infektion dadurch, daß nach der Serokonversion noch über Monate bis Jahre positive erregerspezifische IgG - und IgM - Befunde im ELISA und im Westernblot erhoben werden können, obwohl die Probanden symptomfrei und auch erregerspezifisch sind ([39],[15],[36]), Krüger et al. [81] kamen zu dem Schluß, daß die borrelienspezifische IgG(gesamt)-Konzentration kein zuverlässiger Parameter für das Vorliegen - bzw. den Verlauf einer Lyme-Borreliose ist, da sie auch bei symptomfreien Patienten noch nach bis zu 23 Jahren erhöht sein kann. Hilton et al. [64] fanden intrathekal gebildete borrelienspezifische Antikörper bei Patienten mit Neuroborreliose noch nach bis zu acht Jahren nach Einsetzen der Symptome, obwohl die Erkrankung jeweils ausreichend antibiotisch therapiert worden war (s. auch. [85], [67]). Dies macht die Abgrenzung von klinisch Erkrankten infolge der Infektion gegenüber Seronarben allein aufgrund der Serologie unmöglich, und verursacht falsch positive serologische Ergebnisse.

Die meisten Borrelieninfektionen verlaufen subklinisch [169], so daß zwar erregerspezifische Antikörper-Titer gemessen werden können, aber keine Symptome auftreten [66]. Zum Teil dadurch begründet, kann man erregerspezifische IgM - Antikörper auch bei klinisch gesunden Probanden nachweisen [36]. In einer in Gießen durchgeführten Studie konnten bei 5% der gesunden Normalbevölkerung Antikörpertiter gefunden werden [5]. Andere Studien fanden eine Seroprävalenz von bis zu 40% in der Bevölkerung [164]. Dies kann in den kommerziell erhältlichen Testsystemen zu falsch positiven Ergebnissen führen, da diese Gesunde mit Antikörpertiter fälschlicherweise als krank einstufen würden.

Es kann aber auch der Fall eintreten, daß bei einer Lyme-Borreliose bis zu sechs Wochen keine IgM - Antikörper gefunden werden können, IgG-Antikörper können dann folgen, jedoch über Monate hinweg keinen hohen Antikörpertiter aufzeigen, obwohl klinisch aber eine eindeutige Symptomatik vorliegt ([48],[39],[36]). Diese Tatsache führt zum Teil zu falsch negativen serologischen Befunden. Falsch negative Befunde können auch verursacht sein durch die Verwendung einer für diese Region weniger typischen Genospezies als Testantigen. Bei der Borreliendiagnostik verwenden verschiedene Laboratorien unterschiedliche Genospezies [128]. Diese stammen zum einen aus unterschiedlichen Regionen [157]. In Japan z.B. fanden sich bisher Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. garinii*. In den USA konnten bisher nur Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto gefunden werden, während in Europa verschiedene Stämme der drei Genospezies nebeneinander existieren ([9], [84]). Zum anderen unterscheiden sich die verschiedenen Stämme zum Teil erheblich in ihrer Antigenstruktur ([165], [176]).

Die Diagnose von Symptomen der Lyme-Borreliose ist durch diese Faktoren serologisch nur sehr bedingt möglich. Nur bei einer Neuroborreliose kann man eindeutig die Diagnose stellen, wenn eine spezifische, lokale, intrathekale Produktion von Antikörpern im Liquor nachgewiesen werden konnte, da dem intrathekalen Nachweis spezifischer Antikörper bisher die höchste diagnostische Sicherheit zugeordnet wird ([166],[74],[130]).

Bei allen anderen Syndromen einer Borrelieninfektion ist dieser diagnostische „Beweis“ derzeit noch nicht möglich.

3. Material und Methoden

3.1 Probanden

Für diese Studie wurden nur Probanden ausgewählt, die zuvor in einem der folgenden Institute klinisch untersucht wurden, und deren Seren im Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Gießen auf spezifische Borrelienantikörper getestet wurden. Die beteiligten Kliniken waren das Zentrum für Neurologie, das Zentrum für Hautkrankheiten, das Zentrum für Innere Krankheiten und das Zentrum für Orthopädie der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie die Neurologische Universitätsklinik in Würzburg.

Bei allen Probanden wurden zum Zeitpunkt der Erstvorstellung (= Zeitpunkt der ersten Serumprobenentnahme) die klinischen Diagnosen durch Ärzte der entsprechenden Institute gestellt. Die klinischen Diagnosen wurden durch den serologischen Befund bestätigt. Die Probanden wurden anhand vorher festgelegter anamnestischer, klinischer und spezifischer serologischer Kriterien in drei Probandengruppen eingeteilt:

- seropositive Probanden mit LB-Symptomatik
- seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik
- seronegative Probanden

Insgesamt konnten so 219 Seren von Probanden erfaßt werden (s.Tab.3).

Alle Patientendaten wurden für diese Studie in den Akten der einzelnen beteiligten Institute überprüft. Dabei wurde auf eine eindeutige klinische Diagnose und die entsprechende gesicherte spezifische Borrelienserologie geachtet. Weiterhin wurden Symptome, Therapiestrategien, demographische Daten und alle vorhergegangenen serologischen Untersuchungen erfaßt. Die Serumproben wurden in den Archiven der Institute gesichtet, identifiziert und in ein einheitliches Borrelienarchiv überführt. Durch diese Vorgehensweise war eine eindeutige Identifizierung der Serumproben und der Probanden gesichert.

Tabelle 3: Gruppenzugehörigkeit der untersuchten Probanden

Probandengruppe	Erkrankungen	Syndrome	Anzahl der Probanden
Seropositive Probanden mit LB-Symptomatik (n = 82)	Lyme-Borreliose	EM	11
		Neuroborreliose	57
		Lyme-Arthritis	7
		ACA	7
Seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik (n = 62)	Normalbefund	keine	43
	immunologische Grunderkrankungen	Multiple Sklerose	3
		EMD	2
	andere Grunderkrankungen	Epilepsie	2
		Polyneuropathie	6
		cervikale Myelopathien	3
		ALS	2
	Seronegative Probanden (n = 75)	Normalbefund	
bakterielle Meningitiden		Pneumokokkenmeningitis	11
virale Meningitiden		Herpes Meningitis	14
immunologischen Grunderkrankungen		Multiple Sklerose	16
andere Grunderkrankungen		ALS	10
		multiple Hirninfarkte	4

Legende: ACA: Acrodermatitis chronica atrophicans ALS: Amyotrophe Lateralsklerose,

EM: Erythema migrans, EMD: Encephalomyelitis disseminata

3.1.1 Definition der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik

Probanden, die in die Syndromgruppe der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik eingeordnet wurden, litten zum Zeitpunkt der Erstvorstellung in der Klinik und damit zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter den typischen Symptomen einer Borreliose, wie z.B. einem EM, einer Neuroborreliose, einer Lyme-Arthritis oder einer ACA. Sie wurden in drei Untergruppen eingeteilt, gemäß den von Steere und dem EU concerted concept on Lyme Borreliosis [143] definierten Syndromstadien (Stadium I-III) der Lyme-Borreliose. Die

Probanden mußten bestimmte, vorher als Falldefinitionen festgelegte, klinische und serologische Merkmale aufweisen, um in die Studie aufgenommen werden zu können [108]. Probanden, die an einem Erythema migrans litten, mußten klinisch das typische expandierende rötliche Erythem aufweisen, welches im Verlauf der Erkrankung zentral verblaßt. Die Serumproben von EM-Patienten mußten einen IgG(gesamt)-ELISA-Wert über 200 IU (Sigma-ELISA) aufweisen oder borrelienspezifische Banden im Westernblot (s.u.) zeigen. Die Neuroborreliosepatienten mußten eine von drei festgelegten Definitionen (s.Tab.4) mit all den vorgegebenen Kriterien erfüllen, um in die Studie aufgenommen zu werden. Siebzehn Neuroborreliosepatienten wurden in die Studie aufgenommen, weil sie die Kriterien der Definition I erfüllten. Einundzwanzig Neuroborreliosepatienten wurden aufgrund der Definition II in die Studie aufgenommen, und auf neunzehn Neuroborreliosepatienten trafen die Kriterien der Definition III zu. Dabei zeigten die Probanden klinisch entweder 1. ein neurologisches Syndrom unbekannter Ätiologie, wie z.B. eine Myelitis, Meningitis oder craniale Facialisparesie oder 2. das typische Bild eines Bannwarth-Syndroms. Oder aber 3. die Patienten litten unter einem EM oder ACA, als pathognomische Symptome einer Borrelioseinfektion, sowie einem neurologischen Syndrom unbekannter Ätiologie, wie z.B. eine Polyneuropathie, gekennzeichnet durch typische Sensibilitätsstörungen. Serologisch mußten die Neuroborreliosepatienten einen entzündlichen Liquor cerebrospinalis aufweisen. Dafür wurde in der Fuchs-Rosenthal-Kammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellsedimente wurden entweder mit der Sayk-Kammer oder der Zytocentrifuge hergestellt und mit May-Grünwald gefärbt. Die Zelldifferenzierung in unstimulierte oder stimulierte Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten erfolgte durch Auszählung von je 100 Zellen pro Sediment. Dabei wurde eine Zellzahl von $>50/\mu\text{l}$ als positiv bewertet. Zusätzlich wurde als Charakteristikum eines entzündlichen Liquor cerebrospinalis das Gesamteiweiß mit dem BN 100 Nephelometer der Firma Dade Behring (Marburg,FRG) bestimmt. Ein Wert über 0,5 deutete auf einen entzündlichen Liquor cerebrospinalis hin. Dann wurde die unspezifische, lokale, intrathekal synthetisierte IgG-Konzentration ($\text{IgG}_{\text{local}}$) im Liquor getestet. Hierbei wurde $\text{IgG}_{\text{local}}$ als Prozent der Gesamt IgG-Liquorkonzentration berechnet: $\text{IgG}_{\text{loc}}/\text{IgG}(\text{liquor}) \times 100$. Entsprechend der Impräzision der Methoden sind nur $\text{IgG}_{\text{local}} > 10\%$ als pathologisch anzusehen.

Tab.4: Falldefinitionen der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik in Anlehnung an Oschmann [108] und EUALB[143]

Kriterien zur Falldefinition	Erythema migrans (EM)	Neuroborreliose Definition I	Neuroborreliose Definition II	Neuroborreliose Definition III	Lyme-Arthritis	Akrodermatitis chronica atrophicans (ACA)	
Klinische Kriterien	expandierendes, rötliches Erythem, das dann zentral verblasst	neurologisches Syndrom unbekannter Ätiologie	schmerzhafte Meningoradikuloneuritis (Bannwarth Syndrom)	EM oder ACA und neurologisches Syndrom unbekannter Ätiologie	Unspezifische Mon- oder Polyarthritis	fleckige bis streifenförmige Erytheme auf den Extremitäten- streckseiten, Pseudosklerosierungen, fibroide Knoten	
Serologische Kriterien	<p>IgG (gesamt) ELISA :> 200 IU <u>und /oder</u> Westernblot: IgG:5,18,21,30,35,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM:21,30,35 kd - mind. 1/3 Banden <u>oder</u></p> <p>IgG: 5,18,21,30,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM: 41, 60 kd 2/2 Banden</p>	<p>IgG (gesamt) ELISA :> 200 IU <u>und</u> Westernblot: IgG:5,18,21,30,35,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM: 21,30,35 kd - mind. 1/3 Banden <u>oder</u></p> <p>IgG: 5,18,21,30,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM: 41, 60 kd 2/2 Banden</p>		<p>IgG (gesamt) ELISA :> 200 IU <u>und /oder</u> Westernblot: IgG:5,18,21,30,35,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM:21,30,35 kd - mind. 1/3 Banden <u>oder</u></p> <p>IgG: 5,18,21,30,60,100 kd - mind. 2/7 Banden + IgM: 41, 60 kd - 2/2 Banden</p>			
		Liquor Cerebrospinalis: Zellzahl:> 50 µl, Gesamteiweiß :> 0,5, intrathekale IgG-Synthese	Liquor Cerebrospinalis: Zellzahl:> 50 µl, Gesamteiweiß :> 0,5, intrathekale IgG-Synthese	Liquor Cerebrospinalis: Zellzahl:> 50 µl, Gesamteiweiß :> 0,5, intrathekale IgG-Synthese			

Legende: IU= Internationale Units

Weiterhin mußten die Neuroborreliosepatienten serologisch spezifische IgG-Antikörpertiter (>200 IU) im Serum aufweisen und/oder borrelienspezifische Banden im Westernblot detektiert worden sein. Bei allen Borrelien - Westernblots wurden Antikörper gegen 12 Antigene untersucht

(100,75,66,60,41,35,30,21,18,15,12,5 kd) und wie folgt befundet:

IgG-Banden: 5,18,21,30,35,60,100 kd - mindestens 2/7 Banden vorhanden

und IgM-Banden: 21,30,35 kd - mindestens 1/3 Banden vorhanden

oder

IgG-Banden: 5,18,21,30,60,100 kd - mindestens 2/7 Banden vorhanden

und IgM-Banden: 41, 60 kd - 2/2 Banden vorhanden.

Die Probanden der Definitionsgruppe I wiesen zusätzlich eine spezifische, lokale, intrathekale Antikörpersynthese auf. Diese wurde anhand des sogenannten Antikörperindex nachgewiesen, der wie folgt berechnet wurde:

(borrelienspez.)ELISA Liquor/Serum (U/l) : IgG(gesamt) Serum/Liquor (g/l) x 20

Die Lyme-Arthritis-Patienten mußten klinisch das Symptombild einer unspezifischen Mono- oder Polyarthritis (wiederkehrende, kurze Attacken von objektiven Gelenkschwellungen in einem oder mehreren Gelenken), sowie Serokonversion [IgM und IgG] zeigen. Serologisch wiesen die Lyme-Arthritis-Patienten auch IgG(gesamt)-ELISA-Werte im Serum über 200 IU auf, und/oder borrelienspezifische Banden im Westernblot (s.o.) mußten detektiert werden (s.Tab.4). Probanden, die an einer Akrodermatitis chronica atrophicans (Stadium III) litten, mußten klinisch fleckige bis streifenförmige Erytheme auf den Extremitätenstreckseiten, und Pseudosklerosierungen oder fibroide Knoten aufweisen. Auch diese Probandengruppe mußte IgG(gesamt)-ELISA-Werte im Serum über 200 IU zeigen, und/oder borrelienspezifische Banden im Westernblot aufweisen (s.Tab.4).

Differentialdiagnostisch wurden bei allen Probanden durch Liquoruntersuchungen folgende Infektionen ausgeschlossen: Pneumokokken und Meningokokken (mittels Zellzahl und Liquorkultur) und *Herpes, Varizella Zoster*, Masern oder Röteln (mittels Liquor-ELISA).

3.1.2 Definition der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik

Die 62 seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik wurden im Rahmen anderer Studien klinisch und serologisch untersucht. Dabei stammten die Serumproben der 43 Probanden mit Normalbefund aus einer Studie, die am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin und dem Zentrum für Neurologie der medizinischen Fakultät der Justus-

Liebig-Universität durchgeführt wurde. Diese Studie stellte ein ELISA-Screening von einem größeren Blutspenderkollektiv dar. Alle Spender, deren Seren einen borrelienspezifischen IgG(gesamt)-ELISA-Wert über 200IU aufwiesen, wurden anamnestisch auf borrelienspezifische Symptome befragt, um eine frühere Borrelieninfektion auszuschließen. Diese Probanden wurden in diese Studie aufgenommen. Die übrigen neunzehn seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik stellten sich während des Jahres 1992 in der Lyme-Borreliose-Sprechstunde der Neurologischen Poliklinik vor. In diesen Fällen ergab die weitere Abklärung in fünf Fällen eine Erkrankung mit immunologischer Ursache - wie Multiple Sklerose (MS) oder Encephalomyelitis disseminata (EMD). Diese Probanden wiesen bei der Untersuchung im Magnet-Resonanz-Tomographen (MRT) positive oligoklonale Banden und demyelisierende Herde auf und zeigten klinisch Erkrankungsschübe. Bei den anderen vierzehn Testpersonen wurde andere Grunderkrankungen wie z.B. eine Epilepsie, eine Polyneuropathie, eine cervikale Myelopathie, eine Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder ein Non Hodgkin-Lymphom diagnostiziert (s.Tab.3). Um in diese Studie aufgenommen zu werden, mußten die Probanden einen borrelienspezifischen Serum-IgG(gesamt)ELISA-Wert über 200 IU aufweisen, oder borrelienspezifische Banden mußten im Westernblot sowohl von Serum- als auch von Liquorproben erkannt werden. Von den 62 Probanden dieser Untersuchungsgruppe wiesen 48 Patienten einen ELISA-Wert über 200IU im IgG(gesamt)-ELISA auf. Vierzehn Probanden wurden aufgrund der im Westernblot detektierten borrelienspezifischen Banden in diese Studie aufgenommen.

3.1.3 Definition der seronegativen Probandengruppe

Die Probanden, die in diese Studie als seronegative Probandengruppe aufgenommen wurden, zeigten klinisch die verschiedensten Grunderkrankungen (s. Tab.3). Bei der Auswahl der Grunderkrankungen wurden speziell Patienten mit Multipler Sklerose, Pneumokokkenmeningitis, Herpes - Meningitis, amyotropher Lateralsklerose, oder multiplen Hirninfarkten gewählt, die in anderen Studien mit Borrelien hochgradig kreuzreagiert hatten (ELISA, IFT), und damit fälschlicherweise positiv befundet worden waren. Dabei litten die in die vorliegende Studie aufgenommenen Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme unter keinerlei Symptomen, die auf eine Borrelieninfektion hinweisen könnten. Anamnestisch wurde auch eine frühere Borrelieninfektion ausgeschlossen. Die seronegativen Probanden wiesen keine borrelienspezifischen Antikörpertiter in dem IgG(gesamt)-ELISA auf. Die seronegativen Probandenserum wurden nicht im Westernblot getestet.

3.2 Erregerspezifische Labordiagnostik

Zum Nachweis borrelienspezifischer Antikörpertiter wurden vorab Serumproben von allen Probanden in den entsprechenden Instituten im IgG (gesamt) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder im Westernblot getestet.

Alle Proben wurden in Eppendorfgefäßen (2 ml) bei - 30 °C gelagert und vor der serologischen Untersuchung langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und kurz zentrifugiert.

3.2.1 Westernblot

Der Westernblot wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Gießen durchgeführt. Dabei wurde eine Borrelienkultur der Genospezies B31 in einem modifizierten BSK (Barbour Stoenner Kelly) Medium angelegt. Die Antigenlösung wurde durch eine Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Kreuzreagierende Antikörper wurden durch Zusatz von Ultrasorbent (*Treponema phagedenis* Sonikat, BAG, Lich, FRG) zu den Serumproben zum Teil absorbiert. Die Standardisierung des Westernblots geschah durch das Mitführen eines bekannten Kontrollserums und die Kalibrierung der borrelienspezifischen Antigene durch den Vergleich mit standardisierten Proteinmarkern. Der Westernblot wurde entsprechend der Untersuchung von Engelsing [36] ausgewertet. Dabei wurden folgende Antikörperbanden betrachtet: 100,75,66,60,41,35,30,21,18,15,12,5 kd. Als positiv wurde ein Serum beurteilt, wenn von den 7 IgG-Banden 5,18,21,30,35,60,100 kd mindestens 2/7 Banden vorhanden und von den 3 IgM-Banden 21,30,35 kd mindestens 1/3 Banden vorhanden waren oder von den IgG-Banden 5,18,21,30,35,60,100 kd mindestens 2/7 Banden vorhanden und die beiden IgM-Banden von 41, 60 kd vorhanden waren.

3.2.2 IgG (gesamt) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

An der Universitäts-Nervenklinik in Köln und dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, wurden die Seren mittels eines Sandwich-ELISA untersucht. Dabei wurde in Köln ein selbst entwickelter IgG(gesamt)-ELISA unter Verwendung einer vor Ort isolierten Genospezies verwendet. In Gießen fand der SIATM Lyme Disease ELISA (Sigma Diagnostics, Deisenhofen, FRG) zum Nachweis borrelienspezifischer IgM- und IgG (gesamt)-Antikörpertiter Anwendung. Als Antigen wurde hierbei ein Zellsonikat des Borrelienstammes *B.burgdorferi* sensu stricto B31 eingesetzt. Die Testdurchführung erfolgte nach den vom

Hersteller angegebenen Protokoll. Als positiv wurden in Köln und in Gießen Seren mit einem ELISA-Wert >200 IU bewertet.

3.3 IgG1- bzw. IgG3-ELISA

Die neu entwickelten IgG1- und IgG3-ELISA sind nach dem Prinzip eines sogenannten Sandwich-ELISA aufgebaut. Es wurde eine Enzygnost-Borreliosis 96-Loch Mikrotiterplatte (Dade Behring, Marburg) verwendet. Diese ist mit einem Detergenzextrakt des Borrelienstammes PK₀ der Genospezies *Borrelia afzelii* beschichtet. Die Reagenzien für den IgG3- bzw. den IgG1-ELISA außer den IgG1- bzw. IgG3- Konjugaten entstammten dem handelsüblichen IgG(gesamt)-ELISA-Testkit [Dade Behring, Marburg (Handelsname: Enzygnost Borreliosis)]. Als Absorbens, um Kreuzreaktivitäten mit anderen Erreger zu mindern, wurde dem Probenpuffer des ELISA-Testkits *Treponema phagedenis*-Ultrasonikat zugesetzt. Als Vorbereitung wurden die zu testenden Serumproben in einer Verdünnung von 1:21 (20µl + 400µl) mit Probenpuffer vorverdünnt. Dann wurden von der vorverdünnten Probe 20µl mit 200µl Probenpuffer in eine 96-Loch Mikrotiterplatte eingesetzt - so erhielt man eine Serumprobenverdünnung von 1:231. Bei jedem Testansatz wurden eine Standardkurve (Verdünnungsreihe einer Probe aus einem Pool seropositiver Seren), eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde immer das, im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendete, Referenzserum eingesetzt. Die Negativkontrolle bildete das Serum eines seronegativen Probanden. Alle Proben wurden im Doppelansatz in den Test eingesetzt, um Pipettierungenauigkeiten zu verhindern, und deren Mittelwert wurde für die Auswertung verwendet.

Nach dem Auftragen des Serums wurde der Testansatz 30 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 220µl Waschlösung gewaschen. Dann wurde jeweils 100µl des Konjugates in einer Verdünnung von 1:2.500 für IgG3 und 1:10.000 für IgG1 in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Platte erneut dreimal gewaschen (220µl/Vertiefung). Nun wurde das Substrat in die Platte eingebracht. Dazu wurden die Chromogenlösung und der Substratpuffer 1+10 vorverdünnt und davon 100µl in die Platte eingebracht. Ein erneute Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur folgte. Nach der Inkubation wurde die Substratumsetzung durch Zusatz von 100 µl Stopplösung (Stopping Solution) beendet (Farbumschlag von Blau nach Gelb).

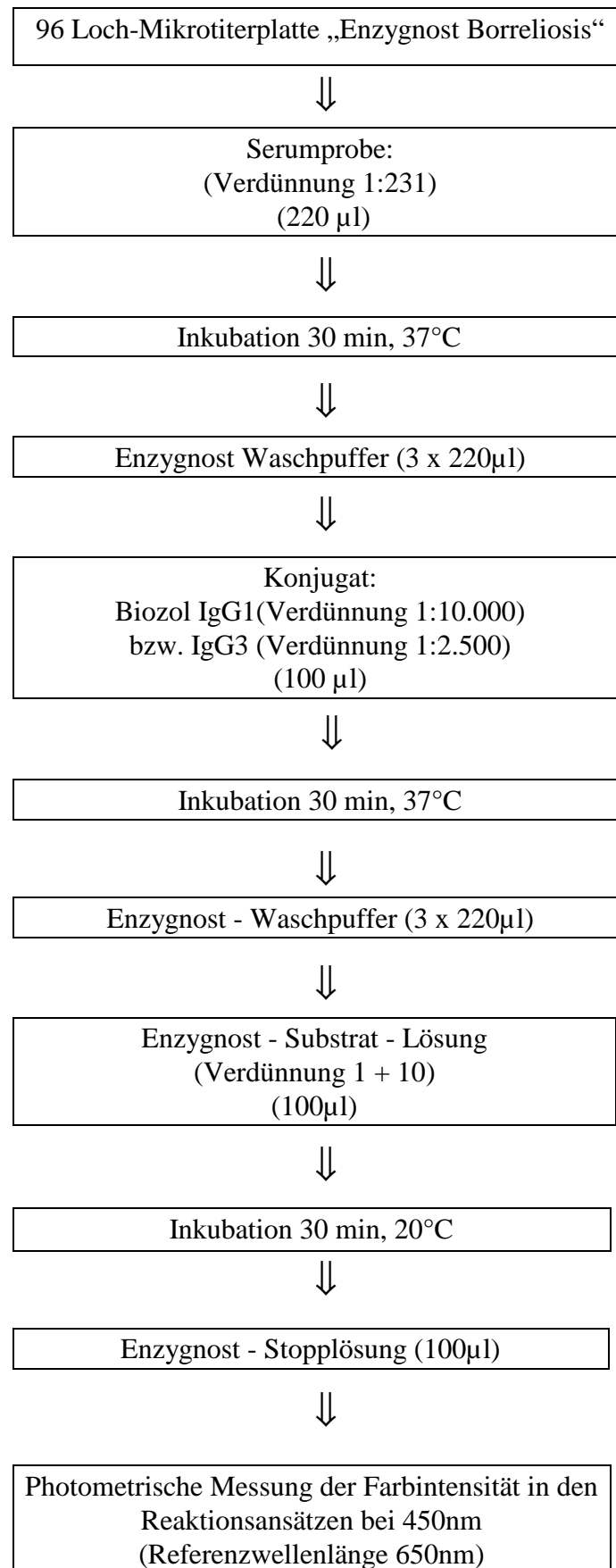


Abb.2: Flußdiagramm zur Durchführung der IgG1- und IgG3-ELISA

Die entstandene Färbung wurde photometrisch im Molecular Devices Kinetic microplate reader Photometer innerhalb von einer halben Stunde bei einer Testwellenlänge 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) ausgewertet ($\Delta OD_{450/650}$) (s. Abb.2).

3.4 Erstellung eines Auswertungssystems für die IgG1- und IgG3-ELISA

Zur Auswertung der einzelnen Meßdaten der IgG1- und IgG3-ELISA mußte zuerst eine möglichst objektive Bezugsgröße etabliert werden, da bei serologischen Testsystemen die Ergebnisse oft aufgrund unterschiedlicher äußerer Testbedingungen stark variieren. Als Bezugsgröße wurde eine Standardkurve etabliert. Dabei wurde ein Poolserum mit einer extrem hohen IgG- $\Delta OD_{450/650}$ und geringer IgM- $\Delta OD_{450/650}$ in den Verdünnungsstufen 1: 7392, 1:1848, 1:462, 1:231, 1:115,5 und 1:28,9 in die ELISA eingesetzt. Die $\Delta OD_{450/650}$ des Poolserums bei einer Verdünnung von 1: 231 wurde mit 1000 Willkürlichen Einheiten (WE) in Anlehnung an Reiber et al. [126] gleichgesetzt, um so ein Bezugssystem für die Testwerte zu erhalten. Die $\Delta OD_{450/650}$ aller anderen Verdünnungsstufen wurden entsprechend dem Verdünnungsfaktor berechnet, z.B. 1:7392 \rightarrow 31,25 WE, 1:115,5 \rightarrow 2000 WE usw.. Wenn man die Verdünnungen des Poolserums bzw. die entsprechenden Willkürlichen Einheiten gegen die $\Delta OD_{450/650}$ in einem Graphen aufträgt und ein vier-Punkt Ausgleichsgraph durch die einzelnen Punkte legt, so erhält man eine Standardkurve (s. Abb.3). Der WE-Gehalt der Verdünnungsstufen wird bei der Darstellung logarithmisch aufgetragen, da mit der Verdünnung der Proben ein großer Konzentrationsbereich abgedeckt wird. Die WE-Werte der Probanden wurden aus der Funktion der Standardkurve berechnet. In die Studiauswertung wurden jedoch nur Werte aufgenommen, die mit ihren $\Delta OD_{450/650}$ - Werten im Bereich des Wendepunktes der Standardkurve lagen, da hier eine Verdünnungsechtheit und damit eine Reproduzierbarkeit der Testwerte gewährleistet ist. Im unteren Bereich der Standardkurve kann das Testsystem spezifische Signale vom sogenannten „Hintergrundrauschen“ schlecht differenzieren und im oberen Bereich der Standardkurve ist aufgrund der hohen $\Delta OD_{450/650}$ eine genaue Differenzierung der Testwerte nicht gewährleistet. Der Meßbereich des Testsystems lag in etwa zwischen 125 und 3000 WE. Proben, die in der Verdünnung von 1:231 höhere Werte erreichten, wurden in einem zweiten Durchgang in höherer Verdünnung getestet und die Willkürlichen Einheiten unter Berücksichtigung des zusätzlichen Verdünnungsfaktors errechnet.

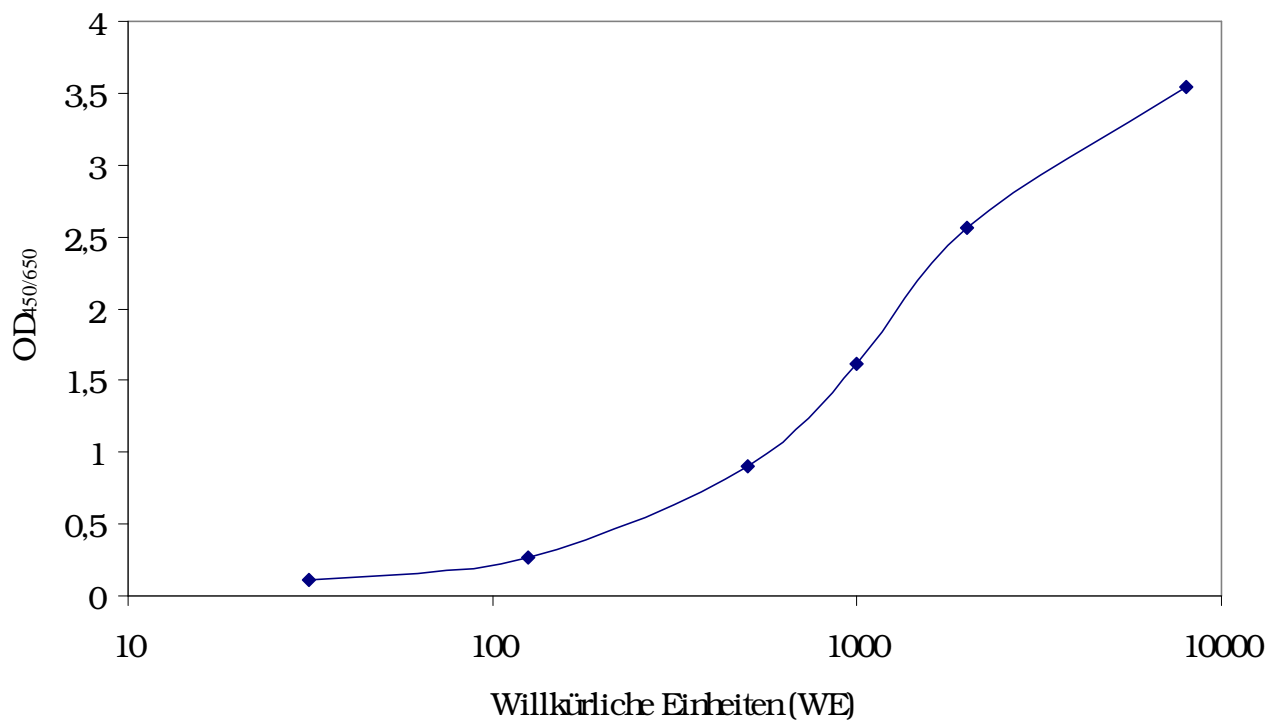


Abb.3: Beispiel einer Standardkurve der IgG1- bzw. IgG3-ELISA

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die Erstellung eines Teiles der graphischen Abbildungen im Rahmen der Materialbeschreibung bzw. der Datenpräsentation erfolgte mit Unterstützung der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Bei der Berechnung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten zur Ermittlung der Inter- und Intra-Assay-Präzisionen [16] und zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der IgG1- und IgG3-ELISA wurden mathematisch definierte Formeln [127] verwendet:

- Standardabweichung (\bar{s}) = $\sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$,

Dabei ist \bar{x} = arithmetische Mittelwert $\left(\frac{x_1 + x_2 + \dots}{n} \right)^{x_n}$,

n = Anzahl der Werte.

- Variationskoeffizient (vk) = $\frac{\bar{s}}{\bar{x}}$

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Anzahl der positiven Ergebnisse mit der angewandten Methode}}{\text{Gesamtzahl der richtig positiven Ergebnisse}} \times 100$$

$$\text{Spezifität (\%)} = \frac{\text{Anzahl der negativen Ergebnisse mit der angewandten Methode}}{\text{Gesamtzahl der richtig negativen Ergebnisse}} \times 100$$

Zur statistischen Prüfung des Einflusses der Gruppenzusammensetzung auf die Signifikanz der Ergebnisse, wurde bei den semiquantitativen Merkmalen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (bzw. Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden paarweisen Vergleich nach Nemenyi) eingesetzt. Weiterhin wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test alle demographischen Daten der Patienten auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß keine der untersuchten Variablen normalverteilt ist. Es wurden deshalb nur nicht parametrische Tests verwendet. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelationsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe der Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = mx+b$) bzw. mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (s). Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem verallgemeinerten Fisher Test/ Chi²-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Zur Bestimmung der Korrelationen der Meßwerte der mit unterschiedlichen Antigenen beschichteten Mikrotiterplatten wurde ein probenverbundener t-Test durchgeführt. Zur Auswertung der Daten dieser Studie wurde Microsoft Excel (Microsoft) verwendet. Die EDV gestützte Sicherung der Patientendaten fand mit dem Statistikprogramm Turbo Statistik (O. Hoffmann, Gießen) statt. Die logistische Regression der Daten zur Ermittlung des Cut-Off-Wertes wurde unter der Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP / Dynamic, Release 7.0 [32] durchgeführt.

Dazu wurde folgendes logistische Modell verwendet:

$$x = -\frac{1}{b} \left[\ln \left(\frac{1 - cw}{cw} \right) + a \right],$$

y = Status des Probanden (1 = seropositiver Proband mit LB-Symptomatik
2 = seropositiver Proband ohne LB-Symptomatik)

x = Einflußgröße = lg (Q IgG3/IgG1)

a = konstant (hier - 0,06603)

b = konstant (hier 2,194)

cw = Cut-Off-Wert

4. Ergebnisse

4.1 Demographische Kennzeichen der Probandengruppen

In dieser Studie wurden 219 Probanden mittels der IgG1- und IgG3-Subklassen-ELISA untersucht. Die Gruppe der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik umfaßte 82 Personen, die seropositive Probandengruppe ohne LB-Symptomatik bestand aus 62 Personen, und die der seronegativen Probanden aus 75 Personen.

Der Altersdurchschnitt der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik lag bei 50 Jahren. Der Altersdurchschnitt der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik betrug 49 Jahre und bei der seronegativen Probandengruppe war 48 Jahre das Durchschnittsalter. Die Altersverteilung schwankte bei den seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik zwischen 7 und 86 Jahren; bei den seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik zwischen 7 und 83 Jahren und bei den seronegativen Probanden zwischen 18 und 80 Jahren (s.Tab.5). Von den Patienten der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik waren 59% männlich und 41% weiblich. Die seropositive Probandengruppe ohne LB-Symptomatik umfaßte zu 55% Männer und zu 45% Frauen. Von den 75 seronegativen Probanden waren 49% Männer und 51% Frauen (s.Tab.5). Zwischen den Untersuchungsgruppen dieser Studie bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Alters - ($p=0,81$) und Geschlechtsstruktur ($p=0,23$). Auch innerhalb der gebildeten Untersuchungsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen bezüglich des Alters und des Geschlechtes gefunden werden.

4.2 Qualitätsparameter der neuen IgG1- und IgG3 - ELISA

Um die Qualität serologischer Testsysteme festzustellen, sind verschiedene Testkriterien festgesetzt worden, anhand derer ein neues Testsystem charakterisiert und dessen Qualität überprüft werden kann. Zu diesen Kriterien gehören die Intra-Assay-Präzision, die Inter-Assay-Präzision und die Überprüfung der Verdünnungsechtheit.

4.2.1 Intra-Assay-Präzision und Inter-Assay-Präzision

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden zwei verschiedene Probandenseren 8-mal in der gleichen Testplatte eingesetzt, um so die Varianz der Ergebnisse innerhalb eines Testansatzes zu bestimmen. Die Intra-Assay-Präzision sollte einen Variationskoeffizienten unter 20% erreichen, denn nur dann ist eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [104] gegeben. Die Variationskoeffizienten des Testsystems dieser Studie lagen fast alle unter 20% (s.Tab.6).

Tabelle 5: Vergleich demographischer Daten der untersuchten Probandengruppen

	Anzahl	Alter (Jahre)		Geschlecht	
		Durchschnitt	Verteilung (Min-Max)	Männlich	Weiblich
seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	82	50	7 - 86	48	34
seropositive Probandengruppe ohne LB-Symptomatik	62	49	7 - 83	34	28
seronegative Probanden	75	48	18 - 80	37	38

Legende: n (gesamt) = 219

Tabelle 6: Intra-Assay-Präzision der IgG3- bzw. IgG1-ELISA

(8-malige Testwiederholung, eine Mikrotiterplatte)

	Mittelwert [$\Delta OD_{450/650}$]	Standardabweichung [$\Delta OD_{450/650}$]	Variationskoeffizient [%]
seronegativer Proband IgG1	0,2	0,04	20,3
seropositiver Proband IgG1	1,2	0,1	7,9
seronegativer Proband IgG3	0,1	0,2	18,8
seropositiver Proband IgG3	1,2	0,1	10,4

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurden die zwei bereits zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision verwendeten Probandenseren in acht verschiedenen Testplatten eingesetzt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten bearbeitet wurden. So wurde die Varianz der Ergebnisse des Testsystems zwischen den einzelnen Testansätzen, die aber zu einer Charge gehören sollten, ermittelt. Die Ergebnisse der Inter-Assay-Präzision sind im Gegensatz zu den Werten der Intra-Assay-Präzision in Willkürlichen Einheiten angegeben, da bei dem Vergleich verschiedener Platten eine Standardkurve als Bezugspunkt mitgeführt werden mußte. Bei der Intra-Assay-Präzision war dies nicht erforderlich, da nur die Varianz innerhalb ein und derselben ELISA-Platte überprüft wurde. Die Inter-Assay-Präzision sollte ebenso wie die Intra-Assay-Präzision einen Variationskoeffizienten unter 20% ergeben [103]. Auch bei der Inter-Assay-Präzision lagen die Variationskoeffizienten der Ergebnisse der seropositive Probanden mit LB-Symptomatik dieses Testsystems in dem vorgegebenen Limit. Bei dem seronegativen Probanden lagen die Varianzen mit 120% und 66% deutlich über 20% (s.Tab.7).

Tabelle 7: Inter-Assay-Präzision der IgG3- bzw. IgG1-ELISA

(8-malige Testwiederholung, 8 verschiedene Mikrotiterplatten, 8 verschiedene Tage)

	Mittelwert [WE]	Standardabweichung [WE]	Variationskoeffizient [%]
seronegativer Proband IgG 1	1,8	2,1	120
seropositiver Proband IgG 1	1374	158	11
seronegativer Proband IgG 3	3,9	2,6	66
seropositiver Proband IgG 3	3143	282	9

4.2.2 Verdünnungsechtheit

Um die Verdünnungsechtheit des Testsystems zu überprüfen, wurden mehrere Probandenseren in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:3696, 1:924, 1:231, 1:115,5) in die Testplatte eingesetzt. Die ermittelten $\Delta OD_{450/650}$ wurden gegen die entsprechenden Verdünnungsstufen in einem Graphen aufgetragen und eine Trendlinie eingefügt. Das Bestimmtheitsmaß (R^2), welches errechnet werden kann, gibt an, inwieweit die berechnete Ausgleichsgerade mit den tatsächlichen Testwerten übereinstimmt und kann Werte von 0 bis 1 annehmen. Nähert sich das Bestimmtheitsmaß dem Wert 1, besteht für die Stichprobe eine gute Korrelation mit der Geraden. Im anderen Extremfall, wenn das Bestimmtheitsmaß 0 ist, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den Testwerten - die Streuung ist zu groß (s. Abb.4). Das Bestimmtheitsmaß in diesen ELISA für die beiden Subklassen beträgt für IgG3 0,99 und für IgG1 0,94. So erhält man die Graphen der Verdünnungsechtheit des Testsystems. Eine optimale Verdünnungsechtheit ist gegeben, wenn der Graph linear, wie in dieser Studie, verläuft.

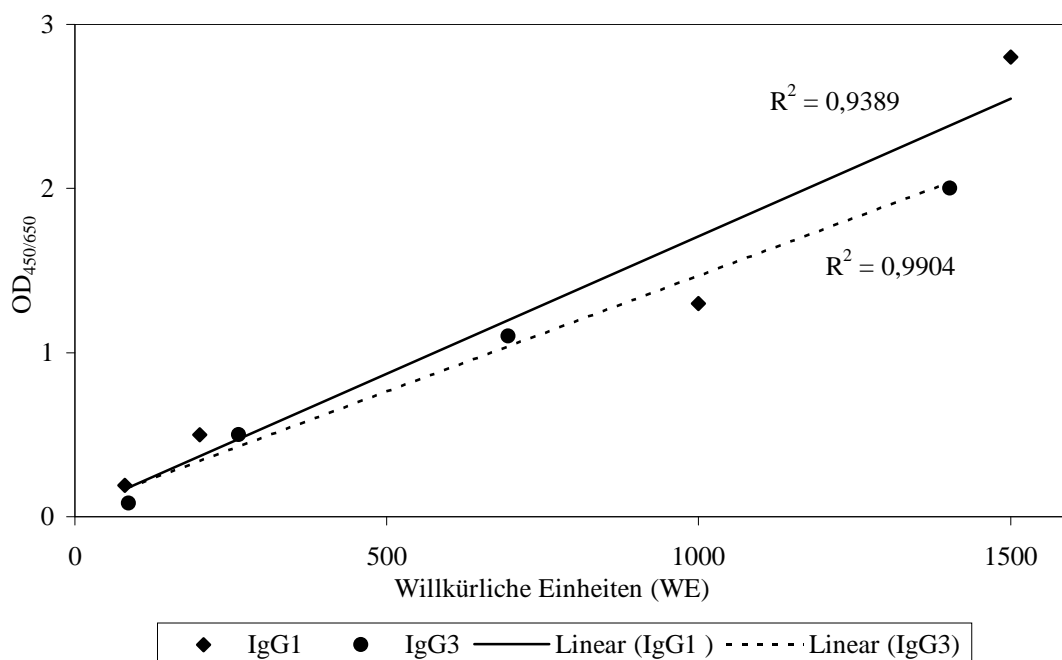


Abb.4: Verdünnungsechtheit der IgG1- und IgG3-ELISA für ein Probandenserum

4.2.3 Untere Nachweisgrenzen der IgG1- und IgG3-ELISA

Die Reproduzierbarkeit eines Testsystems ist im unteren Bereich der Standardkurve nicht optimal, da dort, stärker als in anderen Bereichen, Faktoren, wie z.B. unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktionen anderer Erreger das Testergebnis beeinflussen können. Man nennt diese Faktoren auch das sogenannte „Hintergrundrauschen“. Um Ergebnisse zu erhalten, bei denen dieses Hintergrundrauschen als zusätzlicher Bewertungsfaktor ausgeschlossen werden kann, muß man die untere Nachweisgrenze eines Testsystems festlegen.

Wenn man in Anlehnung an Nicoloff und Spencer [103], davon ausgeht, daß die Reproduzierbarkeit der Testwerte ab einem Variationskoeffizienten über 20% nicht mehr gewährleistet ist, so ist an dem Punkt des Testsystems die untere Nachweisgrenze zu finden, an dem der Variationskoeffizient der Ergebnisse über 20% ansteigt.

Durch die Bestimmung der Intra - oder Inter-Assay-Präzisionen der IgG1- und IgG3-ELISA wurde der Variationskoeffizient der Titer ermittelt. Dabei wurden zwei Seren mit hoher $\Delta OD_{450/650}$, zwei Seren mit einer $\Delta OD_{450/650}$ im mittleren Meßbereich und eine Probe mit geringer $\Delta OD_{450/650}$ in einer Verdünnung von jeweils 1:231 verwendet. Es wurden jeweils acht Testwiederholungen durchgeführt - entweder in einer Testplatte (Intra-Assay-Verfahren) oder in verschiedenen Testansätzen (Inter-Assay-Verfahren). Da bei der Inter-Assay-Präzision im allgemeinen die Varianz der Ergebnisse höher war, wurde diese verwendet, um die untere Nachweisgrenze der Testsystem festzulegen. Dann wurden die Variationskoeffizienten graphisch gegen die arithmetischen Mittel der Ergebnisse aufgetragen, und eine Trendlinie (= Ausgleichskurve) durch die ermittelten Punkte gelegt. Die untere Nachweisgrenze wurde durch den Schnittpunkt der Trendlinie und der horizontalen Linie durch den 20%-Wert auf der Abzisse definiert. Die unteren Nachweisgrenzen des neuen Testsystems wurden bei einem Wert von 120 Willkürlichen Einheiten (WE) für die Subklasse IgG3 und bei 116 Willkürlichen Einheiten (WE) für die Subklasse IgG1 festgesetzt (s.Abb.5+6).

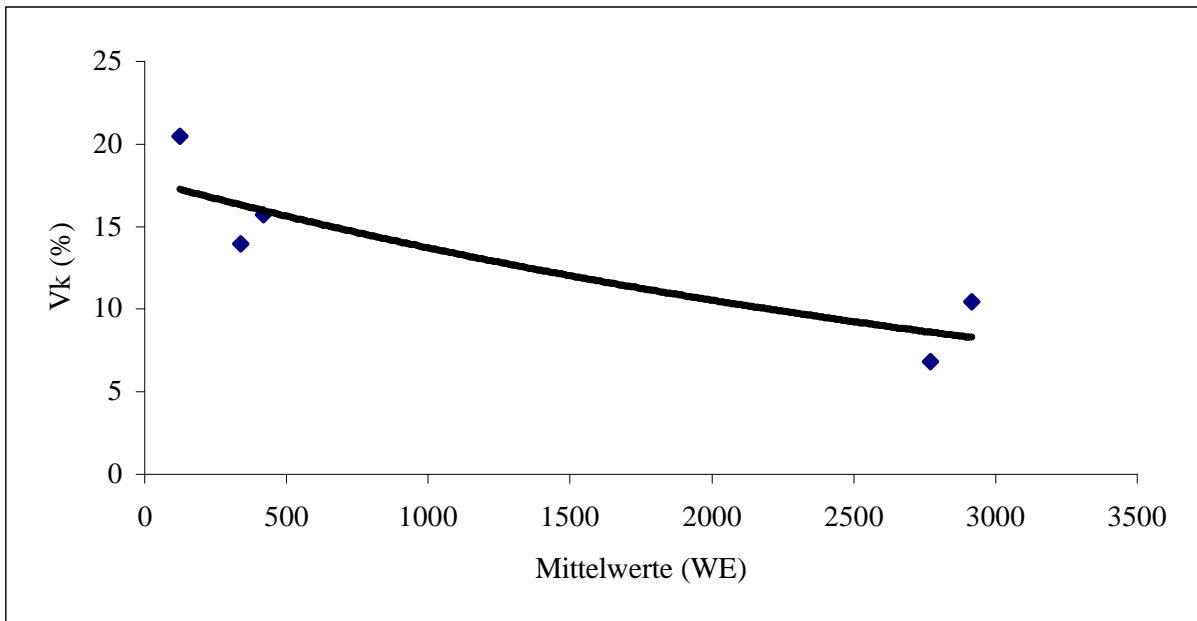


Abb. 5: Mittelwerte und Variationskoeffizient aus der jeweils 8-maligen Messung von fünf Humansenen im IgG3-ELISA

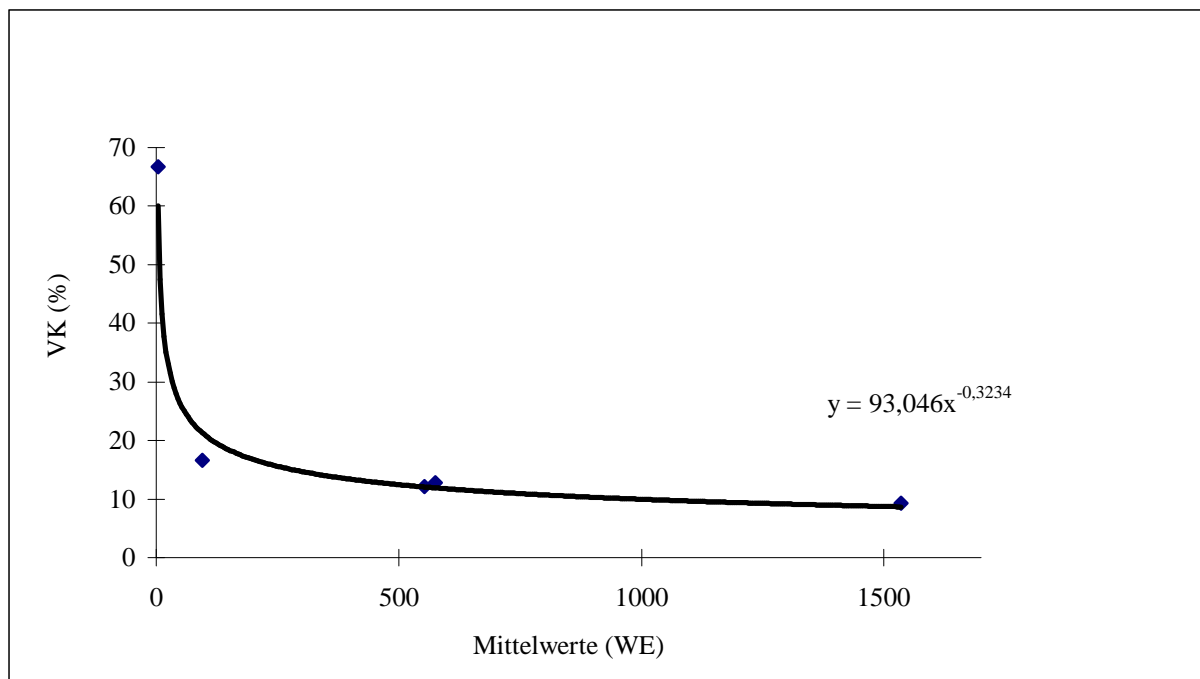


Abb.6: Mittelwerte und Variationskoeffizient aus der jeweils 8-maligen Messung von fünf Humansenen im IgG1-ELISA

4.3 Korrelation zwischen den spezifischen IgG1- bzw. IgG3-Titern

Es konnten in dieser Studie bei der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik keine Zusammenhänge zwischen Geschlecht oder Alter und den spezifischen IgG1-, IgG3-Titern oder IgG3/IgG1-Quotienten gefunden werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Entnahme der Probe nach Symptombeginn und den IgG1- bzw. IgG3-Titern der neuen ELISA bei den seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Test nach Spearman). Die Höhe der spezifischen IgG1-Titer korrelierte signifikant positiv mit der Höhe der IgG3-Titer. Dies galt sowohl bei der Betrachtung aller Probanden zusammen, als auch für die isolierte Betrachtung der drei großen Probandengruppen (s. Tab. 8). Ferner bestanden bei den seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik signifikante Titerunterschiede zwischen den Untergruppen. Die Antikörpertiter (IgG1 und IgG3) der Probanden mit ACA und EM waren niedriger als diejenigen der Neuroborreliose- und Arthritis-Patienten. Bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik bestand eine Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und den IgG1-Titern ($p=0,028$, Spearman-Test) und ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht der Patienten und den IgG3-Testwerten ($p=0,01$, Whitney-Mann-Test). Bei der Gruppe der seronegativen Probanden konnte eine Korrelation zwischen dem Geschlecht und den IgG1-Testwerten ($p=0,002$) ermittelt werden.

Tabelle 8: Korrelation zwischen IgG1- und IgG3-Titern

Probandengruppe	Anzahl der Probanden [n]	Funktion der Regressionsgerade [y =]	Korrelationskoeffizient [R]	Signifikanz [p]
gesamt	219	0,42+0,86 x x	0,73	< 0,001
seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	82	0,09+0,81 x x	0,64	<0,001
seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	62	0,98+0,57 x x	0,65	<0,001
seronegative Probanden	75	0,52+0,63 x x	0,5	<0,001

4.4 Validität der IgG1- und IgG3-ELISA zur Identifizierung seropositiver Probanden

Alle in dem IgG1- und dem IgG3-ELISA ermittelten Meßdaten sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

Bei den beiden seropositiven Probandengruppen lagen 83% der ermittelten Testwerte über den definierten unteren Nachweisgrenzen des Testsystems von 116 WE für die IgG1-Subklasse und 120 WE für die IgG3-Subklasse (s.Tab.10).

Bei den 82 getesteten seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik lagen 89% der gemessenen Testwerte über den definierten unteren Nachweisgrenzen der IgG3- bzw. IgG1-ELISA. Betrachtet man diese Probanden getrennt nach den klinischen Befunden, so erreichten 93% der 57 untersuchten Neuroborreliosepatienten einen Testwert, der oberhalb der definierten unteren Nachweisgrenzen des Testsystems lag. Bei den elf untersuchten EM-Patienten lagen 73% der Testwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze des IgG1- bzw. IgG3-ELISA. Von den sieben untersuchten Lyme-Arthritis-Patienten lagen alle ermittelten Testwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenzen. Bei den sieben Probanden, die an einer ACA litten, lagen 72% der Testwerte oberhalb der definierten unteren Nachweisgrenzen.

Bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik zeigten 74% der 62 gemessenen Probandenserum einen Antikörpertiter, der über den festgelegten unteren Nachweisgrenzen von 116 WE für IgG1 und 120 WE für IgG3 lag (s.Tab.10). Schlüsselt man auch hier die Daten nach den Erkrankungen auf, so lagen 84% der Testwerte der gesunden Probanden oberhalb der unteren Nachweisgrenzen der ELISA. Bei drei von vier (75%) Patienten, die unter einer autoimmunologisch bedingten Grunderkrankung litten, lagen die ermittelten Testwerte unterhalb der definierten unteren Nachweisgrenze des Testsystems. Von den vierzehn anderen Patienten dieser Gruppe lagen 64% der Testwerte oberhalb der definierten Nachweisgrenze für den IgG1- bzw. IgG3-ELISA.

Bei den Testwerten der seronegativen Probanden lagen insgesamt 80% der 75 gemessenen Testwerte unterhalb der definierten unteren Nachweisgrenze von 120 WE im IgG3-ELISA und 89% der Testwerte lagen unterhalb der unteren Nachweisgrenze von 116WE im IgG1-ELISA (s.Tab.10). Betrachtete man die Antikörpertiter nach den verschiedenen Syndromen getrennt, so lagen bei den 20 untersuchten Probanden mit Normalbefund 95% der Testwerte unterhalb unteren Nachweisgrenzen, bei den elf Probanden mit bakterieller Meningitis 73%, bei den 16 Patienten mit autoimmunologisch bedingten Grunderkrankungen 88%, bei den vierzehn Probanden mit einer viralen Meningitis 93% und bei 15 Probanden mit anderen Grunderkrankungen 70% (s.Tab.10).

Tabelle 9: Übersicht über die im IgG1- bzw. IgG3-ELISA ermittelten Daten

Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	ELISA Titer [WE]							
			IgG1			IgG3				
			Min	Max	MW	Stabwn	Min	Max	MW	Stabwn
seropositive Probanden mit LB - Symptomatik	[gesamt]	82	0,5	2989	723	680	0	8192	2104	2063
	EM	11	3	1840	423	531	0	2519	698	669
	Neuroborreliose	57	70	2794	757	676	20	8192	2394	2140
	Lyme - Arthritis	7	438	1404	865	328	191	7730	2842	2441
seropositive Probanden ohne LB - Symptomatik	ACA	7	0,6	2989	766	989	59	2252	1170	801
	[gesamt]	62	1	3345	869	807	1	3911	584	719
	Normalbefund	43	15	3345	1031	824	1	3911	687	794
	immunologischen Grunderkrankung andere Grunderkrankung	5 14	1 34	1368 2027	361 517	581 615	31 31	198 1405	80 412	69 422
seronegative Probanden	[gesamt]	75	0,3	2308	91	299	0,1	2016	140	367
	Normalbefund	20	1	181	37	43	0,79	312	46	72
	bakterielle Meningitis	11	0,3	231	49	58	0,1	454	115	141
	virale Meningitis	14	2	655	77	162	0,1	981	89	248
	immunologische Grunderkrankung	16	3	66	23	18	0,93	1354	156	352
	andere Grunderkrankung	14	6	3208	290	624	1	2016	316	658

Legende: Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; Stabwn: Standardabweichung

Tabelle 10: Übersicht der Meßwerte der Probanden über und unter den unteren Nachweisgrenzen der IgG1- und IgG3-ELISA

Probandengruppe	Erkrankung	Anzahl der Probanden			
		IgG1 -Titer		IgG3-Titer	
		≤ 116 WE	>116 WE	≤120 WE	>120 WE
seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	gesamt	9	73	5	77
	EM	3	8	3	8
	Neuroborreliose	4	53	1	56
	Arthritis	0	7	0	7
	ACA	2	5	1	6
seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	gesamt	14	48	15	47
	Normalbefund	6	37	7	36
	immunologische Grunderkrankung	4	1	4	1
	andere Grunderkrankung	4	10	4	10
seronegative Probanden	gesamt	67	8	60	15
	Normalbefund	18	2	18	2
	bakterielle Meningitis	9	2	7	4
	virale Meningitis	13	1	12	2
	immunologische Grunderkrankung	15	1	14	2
	andere Grunderkrankung	12	2	9	5

4.5 Bestimmung des IgG3/IgG1-Quotienten (Q IgG3/IgG1) bei Probanden mit erhöhten Antikörpertitern gegen *B.burgdorferi*

Wenn man die IgG1- bzw. IgG3-ELISA - Wertepaare der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik und der seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik, nach dem IgG3-Titer sortiert, und beide Gruppen vergleicht, so fällt auf, daß bei den seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik mehr IgG1-Titer niedriger als die korrespondierenden IgG3-Titer sind. Bei

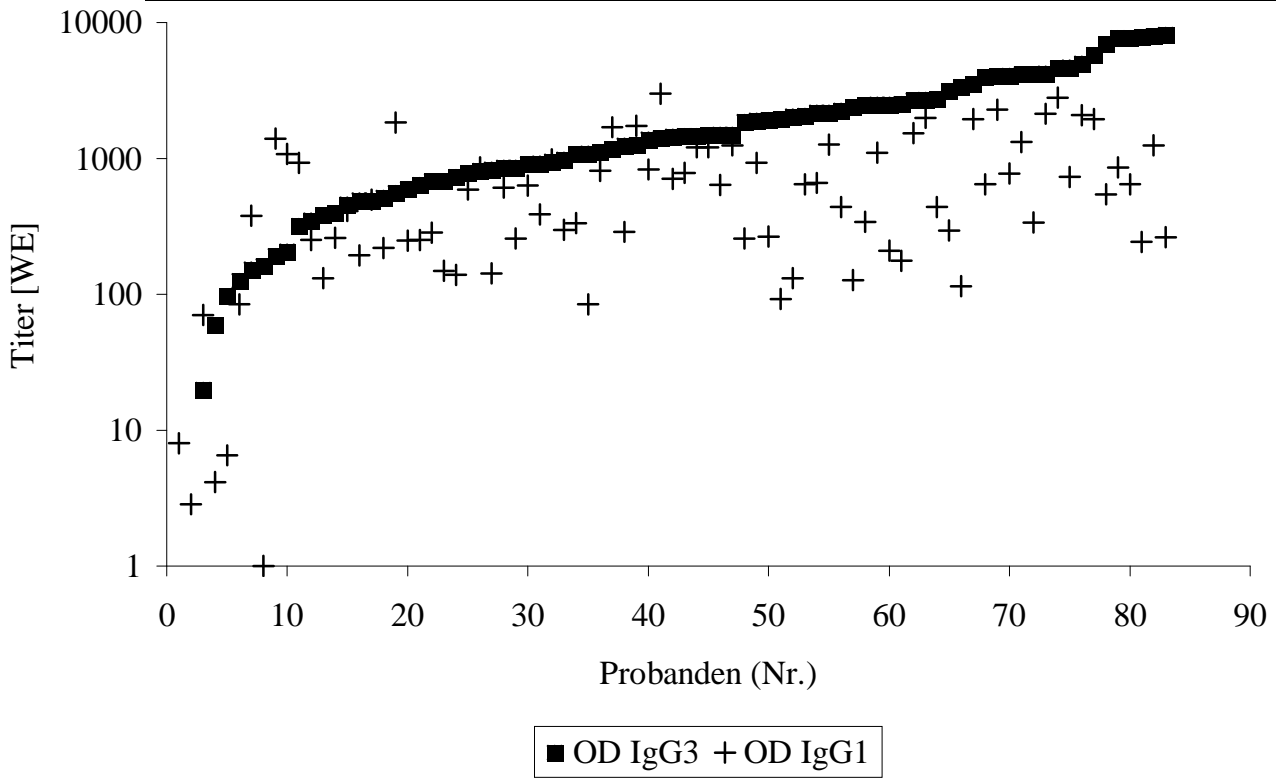


Abb.7: Spezifische IgG3- bzw. IgG1-Titer der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik, aufsteigend sortiert nach den IgG3-Titern

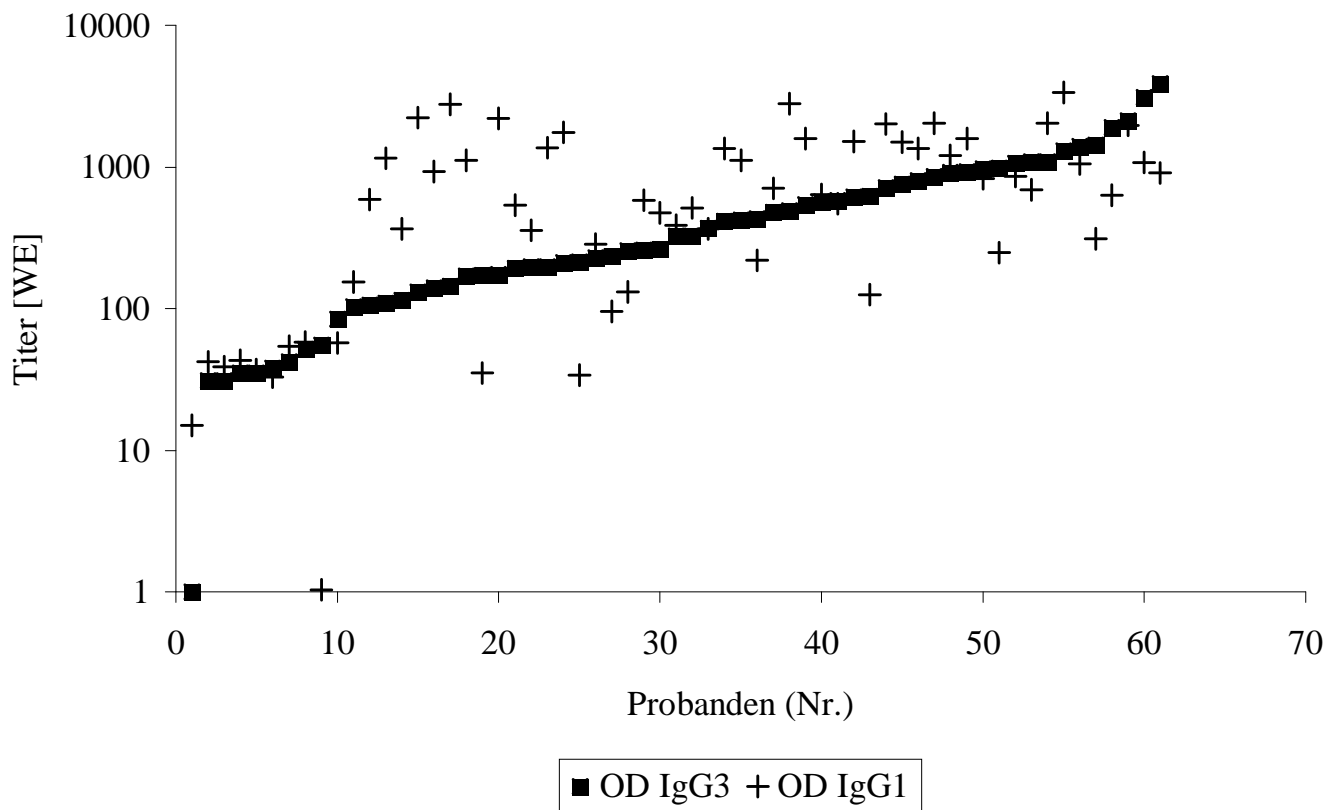


Abb. 8: Spezifische IgG3- bzw. IgG1-Titer der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik, aufsteigend sortiert nach den IgG3-Titern

der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik weisen dagegen mehr IgG1-Titer höhere Werte auf als die zugehörigen IgG3-Titer (s.Abb.7+8). Um den beobachteten Unterschied zwischen den beiden Gruppen der seropositiven Probanden mathematisch faßbar zu machen, wurden in Anlehnung an Reiber [126] der IgG3- und der IgG1- Titer eines jeden Probanden zu dem IgG3/IgG1-Quotienten ($Q \text{ IgG3/IgG1}$) verrechnet. Hierbei wurden allerdings nur diejenigen Probanden berücksichtigt, deren Werte über der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen ELISA gelegen hatten. In der Tabelle 11 sind die jeweils kleinsten und größten $Q \text{ IgG3/IgG1}$ -Werte sowie die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichung der beiden Probandengruppen gegenübergestellt. In beiden Probandengruppen streuten die Werte über denselben Wertebereich. Allerdings war der $Q \text{ IgG3/IgG1}$ -Wert bei den Probanden mit LB-Symptomatik im Durchschnitt signifikant größer als bei den seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik (s.Abb.9). Bei der Gruppe der Erythema migrans - Patienten war der Mittelwert der $Q \text{ IgG3/IgG1}$ im Vergleich zu den anderen seropositiven Probandengruppen mit LB-Symptomatik mit 3,7 am niedrigsten. Den höchsten Mittelwert der $Q \text{ IgG3/IgG1}$ bei den seropositiven Probandengruppen mit LB-Symptomatik zeigten die Neuroborreliosepatienten, die auch den höchsten Maximalwert aufwiesen (s.Tab.11).

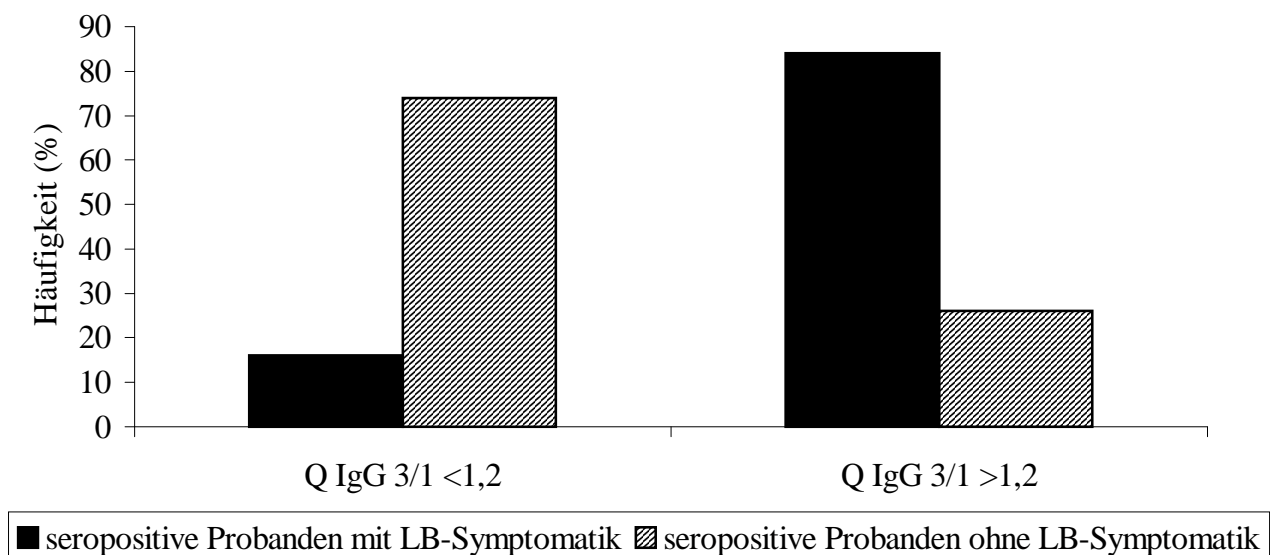


Abb.9: Häufigkeit der $Q \text{ IgG3/IgG1}$ der seropositiven Probanden mit und ohne LB-Symptomatik

Tabelle 11: Übersicht über ermittelten Q IgG3/IgG1 der seropositiven Probandengruppen (n=119)

Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	Q IgG3/IgG1			
			Min	Max	MW	Stabwn
seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	[gesamt]	73	0,1	31,8	5,0	6,6
	EM	8	0,3	14,3	3,7	4,3
	Neuroborreliose	53	0,2	31,8	5,4	7,2
	Lyme-Arthritis	7	0,1	12,0	4,3	5,7
	ACA	5	0,5	15,6	4,8	5,7
seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	[gesamt]	46	0,1	5,0	1,0	1,2
	Normalbefund	36	0,1	5,0	1,1	1,3
	immunologische Grunderkrankungen	1	0,1	0,1	0,1	0
	andere Grunderkrankungen	9	0,2	2,0	0,9	0,5

Legende: Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; Stabwn: Standardabweichung

4.6 Bestimmung eines geeigneten Q IgG3/IgG1-Cut-Off zur Differenzierung von Probanden mit erhöhten Antikörpertitern gegen *B. burgdorferi*

In einem weiteren Schritt wurde versucht, anhand der ermittelten Stichprobendaten einen Grenzwert („Cut-Off“) zu definieren, ab dem ein Q IgG3/IgG1-Wert als positiver Befund („Patient ist an Lyme-Borreliose erkrankt“) bzw. negativer Befund („Patient ist nicht an Lyme-Borreliose erkrankt“) zu werten ist. Da sich die Wertebereiche der beiden untersuchten Probandengruppen überlappten, war ein Cut-Off, bei dem ein serologischer Befund mit einer 100%-igen Sensitivität und 100%-igen Spezifität mit der klinischen Realität übereingestimmt hätte, jedoch nicht offensichtlich. Vielmehr waren Sensitivität und Spezifität des auf dem Q IgG3/IgG1-Wert beruhenden Testsystems zwei gegeneinander wirkende Merkmale. Eine hohe Sensitivität (z.B. 95%) war mit einer geringen Spezifität verbunden (z.B. 35%), und eine geringe Sensitivität (z.B. 30%) mit einer hohen Spezifität (z.B. 90%). In Abbildung 10 ist dieser Sachverhalt graphisch dargestellt. Die beiden Kurven geben die relativen Häufigkeiten der Probanden wieder, die mit dem jeweiligen Cut-Off serologisch „richtigerweise“ als positiv bzw. „richtigerweise“ als negativ erkannt werden. Für diese Analyse und die graphische Darstellung wurden alle Q IgG3/IgG1-Werte logarithmisch transformiert, da die Prüfung der

Daten mit dem Chi²-Test zuvor ergeben hatte, dass die Werte in den beiden Probandengruppen nicht normal verteilt waren. Als optimaler Cut-Off wurde der Wert von 1,2 definiert, bei dem die Sensitivität einen Wert von 84% und die Spezifität einen Wert von 74% annahm.

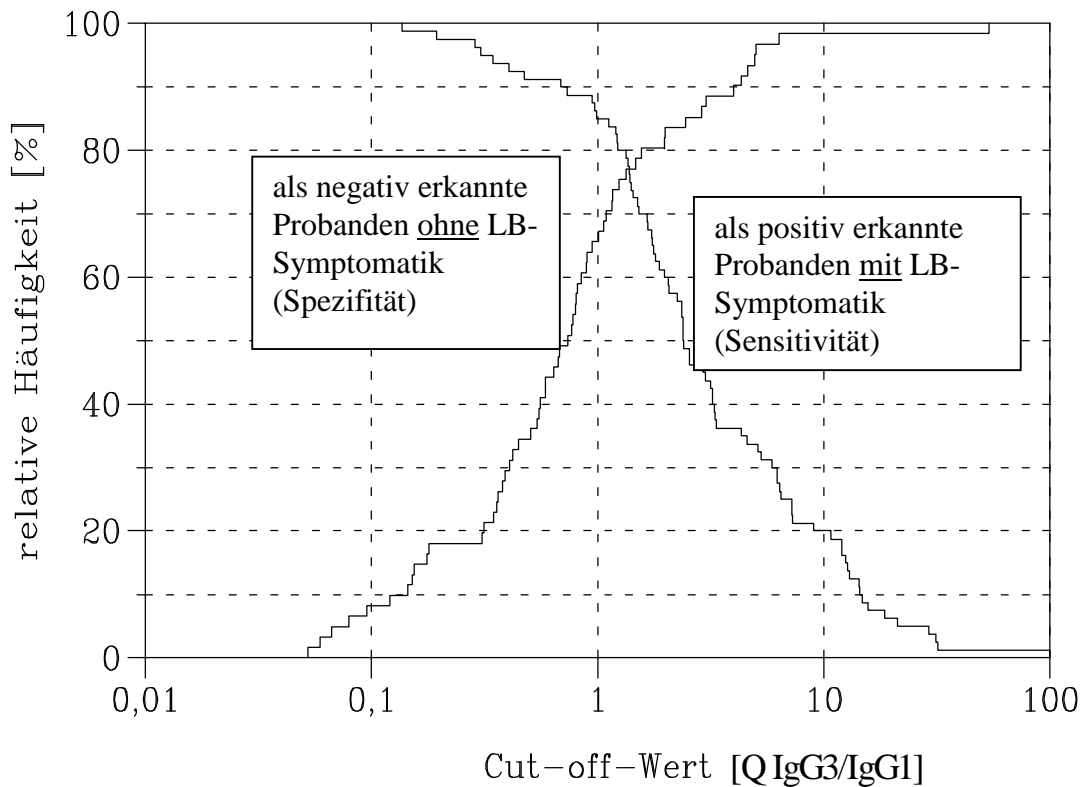


Abb.10: Ermittlung des Cut-Off Wertes als Trennung der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik und der seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik durch Auftragen der relativen Häufigkeiten der richtig erkannten Testwerte gegenüber den möglichen Q IgG3 /IgG1- Cut-Off-Werten (logistische Regression)

4.7 Validität des Q IgG3/IgG1-Cut-Off zur Identifizierung von Probanden mit LB-Symptomatik unter den seropositiven Probanden

In der Tabelle 12 sind die serologischen Befunde zusammengestellt, die sich ergeben, wenn auf die Q IgG3/IgG1-Werte der untersuchten Probanden ein Cut-Off mit dem Wert von 1,2 angewendet wird. 84% der Q IgG3/IgG1 der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik ergaben Werte oberhalb des errechneten Cut-Off von 1,2 (s.Tab.12). Um noch mehr Rückschlüsse aus der Verteilung der IgG3- bzw. IgG1-ELISA Ergebnisse ziehen zu können,

wurden die Ergebnisse der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik getrennt nach Syndromen betrachtet.

So lagen 89% der Neuroborreliosepatienten,

63% der EM-Patienten,

71% der Lyme-Arthritis-Patienten und

80% der ACA-Patienten

mit Ihrem Q IgG3/IgG1 über dem definierten Cut-Off-Wert von 1,2. Bei den EM-Patienten war damit die Gefahr am größten, einen Patienten fälschlicherweise als falsch negativ einzuordnen. Bei Patientengruppen der Stadien II und III einer Lyme-Borreliose (ACA, Neuroborreliosepatienten und Lyme-Arthritis-Patienten) konnte mit Hilfe der Q IgG3/IgG1 dagegen gut abgegrenzt werden, ob die LB-verdächtige Symptomatik tatsächlich kausal mit einer *B. burgdorferi*- Infektion in Verbindung steht.

Bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik lagen 74% der berechneten Q IgG3/IgG1 unterhalb des errechneten Cut-Off Wertes von 1,2 (s.Tab.12). Auch bei der Gruppe der seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik wurde die Verteilung der Q IgG3/IgG1 getrennt nach Syndromen betrachtet. Dabei ergaben die Q IgG3/IgG1 von 75% der Probanden ohne Grunderkrankung und 67% der Probanden mit anderen Grunderkrankungen einen ELISA-Testwerte unter dem definierten Cut-Off Wert von 1,2. Aus der Syndromgruppe der seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik mit immunologischen Grunderkrankungen konnte nur ein Testwert in die Auswertung mit aufgenommen werden, da die anderen Testwerte unterhalb der unteren Nachweisgrenzen lagen. Der Q IgG3/IgG1 dieses einen Testwertes lag ebenfalls unterhalb des definierten Cut-Off-Wertes.

Tab.12 : Übersicht über die Q IgG3/IgG1-Werte oberhalb und unterhalb des berechneten Cut-Off-Wertes von 1,2 (seropositive Probanden)

Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	Anzahl der Probanden	
			Q IgG3/IgG1 ≤ 1,2	Q IgG3/IgG1 > 1,2
seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	[gesamt]	73	12	61
	EM	8	3	5
	Neuroborreliose	53	6	47
	Lyme-Arthritis	7	2	5
	ACA	5	1	4
seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	[gesamt]	46	34	12
	Normalbefund	36	27	9
	immunologische Grunderkrankungen	1	1	0
	andere Grunderkrankungen	9	6	3

4.8 Serologische Verlaufskontrollen bei Neuroborreliosepatienten

In dieser Studie wurden 24 Neuroborreliosepatienten über einen längeren Zeitraum beobachtet, um die IgG1- und IgG3-Titer dieser Patienten über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, und eventuelle Verschiebungen zu ermitteln. Von allen Patienten wurden wenigstens zwei Blutproben entnommen und anschließend im IgG3- bzw. IgG1-ELISA auf *B.burgdorferi* - spezifische Antikörper untersucht. Die erste Blutprobe wurde bei der ersten Vorstellung des Patienten beim behandelnden Arzt vorgenommen und erfolgte somit vor dem Beginn der Therapie. Die Zeitabstände zwischen der Abnahmen der Blutproben lagen zwischen einem und einundzwanzig Monaten (s.Tab.13). Durchschnittlich wurde die zweite Blutprobe nach fünf Monaten abgenommen. Von den vierundzwanzig getesteten Serumproben dieser Verlaufskontrollen lagen beim ersten Meßzeitpunkt 83% der Q IgG3/IgG1 über dem Cut-Off-Wert. Bei dem zweiten Meßzeitpunkt waren noch 58% der ermittelten Q IgG3/IgG1-Werte größer als der Cut-Off-Wert (s.Abb.11). Bei 79% der Probanden war der Q IgG3/IgG1 der zweiten Probe kleiner als der Quotient der ersten Probe, bei 17% der Blutproben stieg der Q IgG3/IgG1 und bei 4% der untersuchten Proben blieb der Q IgG3/IgG1 über den Beobachtungszeitraum konstant. Der Abfall der Q IgG3/IgG1-Werte über die Zeit ist signifikant ($p=0,014$). Es bestand eine Korrelation zwischen der Höhe des

ersten IgG3/IgG1-Quotienten und der Höhe des zweiten Q IgG3/IgG1 ($p < 0,001$; $R = 0,655$; Regressionsgerade $y = 1,3 + 0,5 \cdot X$). Allerdings korrelierten die Veränderung im IgG1/IgG3-Quotienten nicht mit dem zeitlichen Abstand zwischen den Probennahmen ($p = 0,638$; $R = -0,101$, Regressionsgerade $y = 1,9 - 0,9 \cdot X$).

Tabelle 13: Übersicht über Meßdaten der serologische Verlaufskontrollen bei 24 Neuroborreliosepatienten

Probanden-Nr.	Q IgG3/IgG1 ZP1	Q IgG3/IgG1 ZP2	Zeitlicher Abstand von ZP1-ZP2 (Monaten)
17	1,6	4,5	1
7	1,7	1,1	1
14	2,04	3,4	1
18	11,9	6,4	1
23	21	11	1
1	0,3	0,04	1,5
19	10,7	6,6	2
22	13	10,1	2
6	1,24	0,8	3
20	12,43	6,68	3
24	1,6	14,7	4
10	1,7	1,1	4
4	0,3	0,1	5
8	2,38	1,1	5
9	3	1,1	5
15	4,6	3,9	5
11	7,12	1,3	5
16	7,2	3,9	5
21	12,75	7	6
12	4,3	1,8	8
2	0,08	0,1	9
13	2,25	2,25	10
5	1,52	0,18	11
3	0,29	0,1	21

Legende: ZP1= 1. Zeitpunkt der ersten Blutprobenentnahme; ZP2= 2. Zeitpunkt der zweiten Blutprobenentnahme

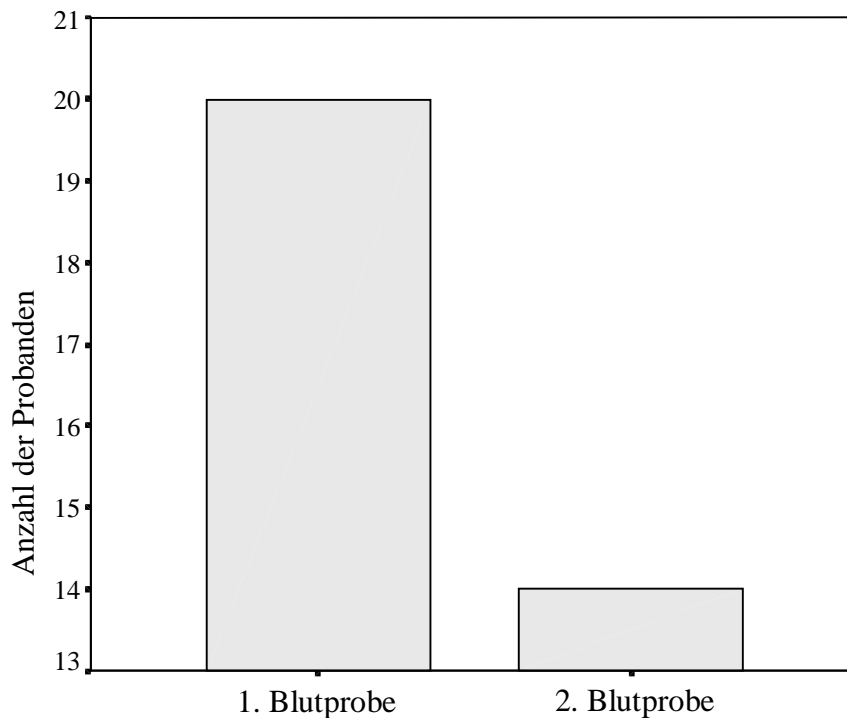


Abb.11: Anzahl der seropositiven Neuroborreliosepatienten (gesamt n =24), deren Q IgG3/IgG1-Werte über dem Cut-Off lagen

4.9 Validität des Testsystems bei Verwendung von anderen Borrelienantigenen

In dieser Studie wurde die Fragestellung untersucht, ob die beobachtete unterschiedliche Verteilung der IgG1- und IgG3-Subklassen bei den beiden seropositiven Probandengruppen nur auf den verwendeten, mit Antigen des Borrelienstammes PK_o (*B.afzelii*) beschichteten ELISA-Platten, auftritt, oder ob man diese unterschiedliche IgG-Subklassenverteilung auch dann findet, wenn die Platten mit Antigenpräparaten aus anderen *B.burgdorferi*-Genospezies beschichtet wurden. Zur Bewertung dieser Frage wurden ELISA-Platten, die mit Antigenen der Borrelienstämme PB_i (*B.garinii*), B31 und Pka II (jeweils *B.burgdorferi* sensu stricto) getestet. Die Konjugate wurden in jeweils doppelter Konzentration (IgG1→1:5000; IgG3→1:1250) eingesetzt, um bekannte Unterschiede in den $\Delta OD_{450/650}$ -Meßwerten auszugleichen und die Standardkurven in den unterschiedlich beschichteten ELISA-Platten aneinander anzupassen. Alle anderen Reagenzien und Arbeitsschritte wurden entsprechend des Protokolls der IgG3- bzw. IgG1-ELISA verwendet und durchgeführt. Die Proben wurden in allen drei Platten unter denselben äußeren Bedingungen untersucht.

Es wurden in den Tests Serumproben von einem seropositiven Probanden mit einer Acrodermatitis chronica atrophicans, drei seropositiven Probanden mit einem Erythema

migrans und zwanzig seropositiven Probanden mit Neuroborreliose getestet. Weiterhin wurden Proben von vierzehn seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik und zwei seropositiven Probanden mit degenerativer Grunderkrankung überprüft. Zwischen den Titern mit dem Stamm Pk_o und den in den verschiedenen anderen ELISA-Platten ermittelten Titern bestanden eindeutige, positive Korrelationen, die anhand des probenverbundenen t-Testes auf Signifikanz geprüft wurden (s. Tab.14).

Tabelle 14: Korrelation zwischen den mit anderen Antigenen ermittelten IgG1- und IgG3-Titern und den mit dem Stamm Pk_o-ermittelten Titern

Herkunft des Testantigens [Stamm]	Probanden	Anzahl der Probanden	Korrelationskoeffizient	Signifikanz [p]
Pbi	seropositive Probanden mit und ohne LB-Symptomatik	40	0,4	0,04
Pka II	seropositive Probanden mit und ohne LB-Symptomatik	40	0,3	0,07
B31	seropositive Probanden mit und ohne LB-Symptomatik	40	0,3	0,08

Die ermittelten Meßdaten der IgG1- und IgG3-ELISA der untersuchten Probandengruppen und Untergruppen auf allen IgG1- bzw. IgG3-ELISA-Platten sind in Tabelle 15 zusammengestellt.

Bei den 24 getesteten seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik lagen

- 92% der Testwerte auf den mit Antigen des Stammes Pbi
- 79% der Testwerte auf den mit Antigen des Stammes Pka II
- 83 % der Testwerte auf den mit Antigen des Borrelienstammes B31

beschichten IgG3- bzw. IgG1-ELISA über den unteren Nachweisgrenzen von 116 WE für IgG1 und 120 WE für IgG3 (s.Tab.16).

Betrachtet man die Syndromgruppen der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik, so erreichten von den 20 untersuchten Neuroborreliosepatienten 90% der auf den mit Antigen

des Stammes Pbi beschichteten ELISA-Platten einen Testwert, der oberhalb der definierten unteren Nachweisgrenzen des Testsystems lag, 80% auf den mit Antigen des Borrelienstammes PkaII und 85% mit Antigen des Stammes B31 beschichteten ELISA-Platten. Bei den drei untersuchten EM-Patienten lagen bei dem mit Antigen des Borrelienstammes Pbi beschichteten IgG1- bzw. IgG3-ELISA 100% der Testwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze der IgG1- bzw. IgG3-ELISA, und bei den mit Antigen der Stämme Pka II und B31 beschichteten IgG1- bzw. IgG3-ELISA erreichten 67% einen Testwert oberhalb der unteren Nachweisgrenzen des Testsystems. Der untersuchte seropositive Proband mit LB-Symptomatik, der an einer ACA litt, lag bei allen IgG1- bzw. IgG3-ELISA oberhalb der definierten unteren Nachweisgrenzen.

Bei den 16 seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik zeigten

- 75% der Testwerte auf den mit Antigen des Borrelienstammes Pbi
- 62,5% der Testwerte auf den mit Pka II-Antigen
- 56% der Testwerte auf den mit B31-Antigen

beschichteten ELISA-Platten, einen Antikörpertiter, der über den festgelegten unteren Nachweisgrenzen lag (s.Tab.16).

Betrachtete man auch hier die Syndromgruppen, so lagen 79% der gemessenen Testwerte der seropositiven Probanden ohne Grunderkrankung bei dem mit Antigen des Borrelienstammes Pbi beschichteten ELISA-Platten, 64% bei den mit Pka II-Antigen beschichteten IgG1-bzw. IgG3-ELISA-Platten und 57% bei den mit Antigen des Borrelienstammes B31 beschichteten ELISA-Platten, oberhalb der unteren Nachweisgrenzen des Testsystems. Von den zwei untersuchten Probanden die neben einer anderen Grunderkrankung einen borrelienspezifischen Antikörpertiter aufwiesen, lagen bei allen drei IgG1- bzw. IgG3-ELISA 50% der Testwerte oberhalb der definierten Nachweisgrenzen (s.Tab.16).

Es wurde in einem weiteren Schritt wiederum versucht, anhand der ermittelten Stichprobendaten einen Cut-Off zu definieren. Dabei wurden nur Meßwerte von Proben verwendet, die oberhalb der unteren Nachweisgrenzen lagen und von diesen wurden dann Q IgG3/IgG1-Werte berechnet (s.Tab.17). Da auch hier sich die Wertebereiche überlappten, war ein Cut-Off, bei dem der serologische Befund mit einer 100%-igen Sensitivität und 100%-igen Spezifität mit der klinischen Realität übereingestimmt hätte, nicht offensichtlich. Vielmehr waren auch hier Sensitivität und Spezifität des auf den Q IgG3/IgG1-Werten beruhenden Testsystemen zwei gegeneinander wirkende Merkmale. Für die Analyse zur Definition des Cut-Off wurden auch hier alle Q IgG3/IgG1-Werte logarithmisch transformiert,

da die Prüfung der Daten mit dem Chi^2 -Test zuvor ergeben hatten, dass die Werte in den Probandengruppen nicht normal verteilt waren. Als optimaler Cut-Off wurde auch hier für alle unterschiedlich beschichteten IgG1-/IgG3-ELISA der Wert von 1,2 definiert.

Bei den seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik lagen auf den ELISA-Platten des Borrelienstammes PBi 91%, bei den mit Antigen des Pka II-Borrelienstammes beschichteten IgG1- bzw. IgG3-ELISA 89% und beim B31-Borrelienstamm 75% der Q IgG3/IgG1 oberhalb des Cut-Off von 1,2 (s.Tab.18).

Bei den auf den verschiedenen ELISA-Platten untersuchten seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik ergab die Berechnung der Q IgG3/IgG1 bei den mit Antigen des Borrelienstammes PBi beschichteten IgG1- bzw. IgG3-ELISA-Platten in 75% der Fälle, beim Pka II-Borrelienstammes 70% und beim Borrelienstamm B31 67% Werte unter dem Cut-Off (s.Tab.18).

Tabelle 15: Übersicht über die Meßdaten der IgG1- bzw. IgG3-ELISA-Plattens mit unterschiedlichen Antigenbeschichtung

Herkunft des Test- antigens [Stamm]	Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	IgG1			IgG3				
				Min	Max	Stabwn	Min	Max	Stabwn		
Pbi	seropositive	[gesamt]	24	41	2837	749	686	132	5940	1616	1739
	Probanden mit LB - Symptomatik	EM	3	235	377	299	59	691	1244	1033	244
		Neuroborreliose	20	41	2349	709	545	132	5940	1476	1610
		ACA	1	2837	2837	-	-	5892	5892	-	-
	seropositive	[gesamt]	16	32	2581	1036	752	1	5056	836	1403
	Probanden ohne LB - Symptomatik	Normalbefund	14	32	2581	1118	754	1	5056	733	1358
Pka II		andere Grunderkrankung	2	53	868	461	408	1	3009	1505	1504
	seropositive	[gesamt]	24	1	4426	1144	1361	109	7813	2168	2374
	Probanden mit LB - Symptomatik	EM	3	1	361	147	155	489	845	639	151
		Neuroborreliose	20	1	4426	1153	1294	109	7813	2228	2412
		ACA	1	3959	3959	-	-	5621	5621	-	-
	seropositive	[gesamt]	16	1	2597	974	806	1	9147	1001	2174
B31	Probanden ohne LB - Symptomatik	Normalbefund	14	1	2597	1079	803	1	9147	1018	2300
		andere Grunderkrankung	2	1	471	236	235	1	1759	880	879
	seropositive	[gesamt]	24	57	4996	1364	1342	109	7959	1984	2389
	Probanden mit LB - Symptomatik	EM	3	180	334	261	63	231	824	509	244
		Neuroborreliose	20	57	3929	1347	1137	109	7959	2020	2407
		ACA	1	4996	4996	-	-	5813	5813	-	-
seropositive	[gesamt]	16	1	3327	1487	1085	1	1818	487	633	
Probanden ohne LB - Symptomatik	Normalbefund	14	1	3327	1677	1040	1	1818	428	565	
	andere Grunderkrankung	2	46	458	252	206	1	1742	872	871	

Legende: Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; Stabwn: Standardabweichung

Tabelle 16: Übersicht über die Verteilung der ELISA-Meßwerte über und unter den unteren Nachweisgrenzen der IgG1- und IgG3-ELISA in Abhängigkeit des verwendeten Testantigens

Herkunft des Testantigens [Stamm]	Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	Anzahl der Probanden			
				IgG1 -Titer [WE]		IgG3-Titer	
				≤ 116	>116	≤ 120	>120
Pbi	seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	[gesamt]	24	2	22	0	24
		EM	3	0	3	0	3
		Neuroborreliose	20	2	18	0	20
		ACA	1	0	1	0	1
	seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	[gesamt]	16	3	13	4	12
		Normalbefund	14	2	12	3	11
		andere Grunderkrankung	2	1	1	1	1
Pka II	seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	[gesamt]	24	5	19	2	22
		EM	3	2	1	0	3
		Neuroborreliose	20	3	17	2	18
		ACA	1	0	1	0	1
	seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	[gesamt]	16	3	13	6	10
		Normalbefund	14	2	12	5	9
		andere Grunderkrankung	2	1	1	1	1
B31	seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	[gesamt]	24	2	22	4	20
		EM	3	0	3	1	2
		Neuroborreliose	20	2	18	3	17
		ACA	1	0	1	0	1
	seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik	[gesamt]	16	3	13	7	9
		Normalbefund	14	2	12	6	8
		andere Grunderkrankung	2	1	1	1	1

Tabelle 17: Übersicht über die ermittelten Q IgG3/IgG1 der seropositiven Probandengruppen in Abhängigkeit des verwendeten Testantigens

Herkunft des Testantigens [Stamm]	Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	Q IgG3/IgG1				
				Min	Max	MW	Stabwn	
Pbi	seropositive	[gesamt]	22	0,1	11,0	3,3	2,9	
	Probanden mit	EM	3	2,4	5,3	3,85	1,4	
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose		18	0,1	11,0	3,1	3,0
			ACA	1	2,1	2,1	-	-
		[gesamt]		12	0,1	3,5	0,8	1,0
	seropositive	Normalbefund		11	0,1	3,5	0,9	1,0
	Probanden ohne	andere		1	0,2	0,2	0,2	0
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen							
Pka II	seropositive	[gesamt]	19	0,1	18,8	3,4	4,2	
	Probanden mit	EM	2	1,3	3,1	2,2	0,9	
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose		16	0,1	18,8	3,5	4,4
			ACA	1	1,4	1,4	-	-
		[gesamt]		10	0,1	3,7	1,0	1,1
	seropositive	Normalbefund		9	0,1	3,7	1,1	1,2
	Probanden ohne	andere		1	0,2	0,2	-	-
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen							
B31	seropositive	[gesamt]	20	0,1	16,0	3,0	3,7	
	Probanden mit	EM	2	1,4	3,1	2,3	,8	
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose		17	0,1	16,0	3,1	4,0
			ACA	1	1,2	1,2	-	-
		[gesamt]		9	0,1	3,8	0,6	0,9
	seropositive	Normalbefund		8	0,1	3,8	0,7	1,0
	Probanden ohne	andere		1	0,2	0,2	0,2	0
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen							

Legende: Min: Minimalwert; Max: Maximalwert; MW: Mittelwert; Stabwn: Standardabweichung

Tab.18 : Verteilung der Probanden anhand der Höhe ihres Q IgG3/IgG1-Wertes in
Abhängigkeit des verwendeten Testantigens

Herkunft des Test- antigens [Stamm]	Probandengruppe	Klinischer Befund	Anzahl	Anzahl der Probanden	
				Q IgG3/IgG1 ≤ 1,2	Q IgG3/IgG1 > 1,2
Pbi	seropositive	[gesamt]	22	2	20
	Probanden mit	EM	3	0	3
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose	18	2	16
		ACA	1	0	1
		[gesamt]	12	9	3
	seropositive	Normalbefund	11	8	3
	Probanden ohne	andere	1	1	0
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen				
Pka II	seropositive	[gesamt]	19	2	17
	Probanden mit	EM	2	0	2
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose	16	2	14
		ACA	1	0	1
		[gesamt]	10	7	3
	seropositive	Normalbefund	9	6	3
	Probanden ohne	andere	1	1	0
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen				
B31	seropositive	[gesamt]	20	5	15
	Probanden mit	EM	2	0	2
	LB-Symptomatik	Neuroborreliose	17	5	12
		ACA	1	0	1
		[gesamt]	9	6	3
	seropositive	Normalbefund	8	5	3
	Probanden ohne	andere	1	1	0
LB-Symptomatik	Grunderkrankungen				

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Probandenrekrutierung

Die Qualität der Ergebnisse einer Studie hängt im wesentlichen von der exakten Auswahl der zu untersuchenden Probanden ab ([108],[70]). Die Probanden dieser Studie wurden retrospektiv in Anlehnung an das Konzept der EU „concerted action on Lyme- Borreliose“ (EUCALB)[143] mittels definierter Falldefinitionen ausgewählt, um repräsentative Ergebnisse zu erzielen. Durch diese Art der Probandenrekrutierung konnte eine eindeutige Identifikation und Gruppenzugehörigkeit jedes einzelnen Probanden dieser Studie erzielt werden. Eine mögliche Fehlerquelle bei der Probandenauswahl bestand darin, daß nicht alle Probanden einheitlich mit demselben diagnostischen Verfahren vorgetestet waren, so daß mögliche Unterschiede der Voruntersuchungen zu falschen Ergebnissen hätten führen können. Alle nicht konformen Testergebnisse wurden aber in dieser Studie nochmals in dem IgG(gesamt)-ELISA (Dade Behring, Enzygnost) überprüft und verifiziert, um so diese Fehlerquelle zu minimieren. Eine weitere mögliche Fehlerquelle der Probandenselektion der Studie ist, daß die Daten vielleicht in den zur Einteilung der Probandengruppen gesichteten Sekundärdaten nicht korrekt waren, daß Rohdaten z.B. nicht korrekt interpretiert wurden und somit u.U. falsche Diagnosen gestellt worden waren. Dies wurde durch eine Überprüfung aller Probandenrohdaten in den Archivakten ausgeschlossen.

Desweiteren wurden alle Proben der Probanden vor Therapiebeginn bei Erstvorstellung in den Kliniken abgenommen, da es ein Ziel dieser Studie war, eine mögliche veränderte Dominanz der borrelienspezifischen IgG-Antikörper über einen längeren Zeitraum unter Therapie festzustellen. So konnte ein einheitlicher und damit vergleichbarer Status aller Probanden ohne medizinische Einflußnahme untersucht werden.

Ein weiterer möglicher Kritikpunkt bei der Probandenauswahl besteht in der Diagnosestellung der bisher nur sehr schwer zu diagnostizierenden Lyme-Arthritis. Dabei ist das Symptombild eher unspezifisch und nicht eindeutig von anderen Differentialdiagnosen abgrenzbar. Deshalb bestand in dieser Studie auch die größte Gruppe bei dem seropositiven Kollektiv mit LB-Symptomatik aus Probanden mit der besser zu diagnostizierenden Neuroborreliose. Außerdem wurde in dieser Studie die Diagnose Lyme-Arthritis durch erfahrene Fachärzte anhand des klinischen Bildes und der Serologie gestellt. Alle Probanden erfüllten die Kriterien der von der EU-Kommission empfohlenen Falldefinition. Trotzdem können auch in dieser Studie mögliche Fehldiagnosen bei den Lyme-Arthritis-Probanden gestellt worden sein.

5.2 Diskussion der Methoden der serologischen Voruntersuchungen

Für die Beurteilung der vorliegenden Studienergebnisse ist, neben der sorgfältigen Probandenauswahl, auch der methodische Ansatz wichtig. Im folgenden sollen die in den serologischen Voruntersuchungen verwendeten Methoden einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Je nach eingesetztem Testverfahren können erregerspezifische Antikörper im Serum laut einer Studie von Oschmann [107] bei 69 bis 87% der Probanden nachgewiesen werden. Andere Autoren ([56],[148],[169],[141],[73]) geben 50 bis 89% an. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen ist z.T. mit Eigenschaften des eingesetzten Testsystems, der Methodik zur Bestimmung der lokalen Antikörpersynthese, des Zeitintervalls zwischen Infektion und Probeentnahme sowie mit der Auswahl des Patientenkollektivs erklärbar. Die Nachweisrate borrelienspezifischer Antikörper im Serum kann abhängig sein vom verwendeten Borrelienstamm und der Antigenpräparation ([50],[33]). Der in den serologischen Vortests (ELISA, Westernblot) dieser Studie eingesetzte *Borrelia burgdorferi* Stamm B31 ist das erste Isolat von Shelter Island ([11],[69]). Dieser Stamm gehört zur Genospezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto [84], die hauptsächlich in den USA vorkommt.

Der IgG(gesamt)-ELISA ist als Untersuchungsmethode für die Borreliendiagnostik gut geeignet. Zum einen ist er im Verhältnis zum Westernblot deutlich billiger, so daß der ELISA auch als Screeningmethode eingesetzt werden kann. Zum anderen ist er durch die photometrische Bestimmung nicht von der Subjektivität der Beurteilung eines Untersuchers abhängig. Außerdem ist der IgG(gesamt)-ELISA je nach Antigenpräparation deutlich spezifischer als der IFT [30] und laut Oschmann [109] gleich spezifisch und sensitiv wie ein Westernblot. Beim IgG(gesamt)-ELISA ist eine Differenzierung der Antikörper anhand der erkannten Epitope nicht möglich. Weiterhin kann mit einem IgG(gesamt)-ELISA keine Aussage über die Symptomatik der Erkrankung gemacht werden, so daß die alleinige serologische Diagnose, aufgrund der oben erwähnten hohen Durchseuchungsrate in der Bevölkerung mit einem IgG(gesamt)-ELISA zwangsläufig zu vielen falsch positiven Ergebnissen führt.

In den für diese Studie durchgeführten Voruntersuchungen wurde der Westernblot nach der Methode von Engelsing [36] durchgeführt. Dieser Westernblot zeichnet sich, verwendet man ihn für die Untersuchung von Liquor und Serum und weist somit die spezifische, lokale, intrathekale Antikörpersynthese nach, durch eine höhere Spezifität als der IFT und eine dem IgG(gesamt)-ELISA vergleichbare Sensitivität und Spezifität aus. Neben der Identifikation der

Antigene, müssen Kreuzreaktionen im Westernblot zwischen unspezifischen Antikörpern des Probandenserums und dem Antigen weitgehend ausgeschlossen werden, um die Beurteilung eines Westernblots sicher durchführen zu können. Bei einem Teil der untersuchten Antigene wurden in einer Untersuchung von Bruckbauer et al. [18] mehr oder weniger starke Kreuzreaktionen mit den Antigenen anderer Spirochäten gefunden. Auch Kreuzreaktionen zu Leptospiren, Salmonellen, Yersinien, Pseudomonaden, Neisserien, Campylobacter, Pasteurellen, Listerien, Legionellaceae [52] und mit Antigenen des Epstein-Barr-Virus sowie des Cytomegalovirus [48] wurden beschrieben. Weitere Studien zeigten, daß einige Antigene eine niedrige Spezifität besitzen ([5],[38]). Besonders stark ist die Kreuzantigenität zwischen *Borrelia burgdorferi* und apathogenen Treponemen, zum Beispiel *Treponema phagedenis* [4]. Das Antigen von *Treponema phagedenis* wurde deshalb in den Voruntersuchungen als Absorbens für unspezifische Antikörper verwendet, so daß Kreuzreaktivitäten von Probandenserum reduziert wurden. Trotz dieser aufwendigen Verbesserungen des verwendeten Westernblots ist er schon aufgrund seiner hohen Kosten [52] und der Aufwendigkeit der Methode, nicht als Screeningmethode für größere Patientenkollektive geeignet. Im Epidemiologischen Bulletin [130] wird darüber hinaus bei der Zusammenstellung der Ergebnisse des Borrelien-Experten-Meetings in Freiburg [75], der Westernblot nur als Bestätigungstest aber nicht als Screening-Test empfohlen. Auch zur Bestätigung wird er nach Meinung der Experten dem hohen Anspruch der Praxis nicht gerecht, da bei den kommerziell erhältlichen Testkits die zuverlässige Identifikation spezifischer Banden nur selten eindeutig möglich ist. Weiterhin müssen die Bandenmuster von erfahrenen Untersuchern ausgewertet werden, um eine sichere und klare Beurteilung eines Westernblots zu erreichen, so daß nur solche Laboratorien dieses Testsystem einsetzen können, die Routine bei der Durchführung derartiger Testmethoden besitzen [52]. Daher wird in Abhängigkeit von den individuellen Auswertungskriterien der Untersucher eine Variabilität der Spezifität von 82 bis 96% sowie der Sensitivität von 78 bis 100% beschrieben ([33],[77],[111],[175]). Auch mit Hilfe eines Westernblots ist es nicht möglich, zwischen der mit einer akuten Infektion assoziierten Antikörperantwort und einem persistierenden Antikörpertiter, der aufgrund eines vorangegangenen Kontaktes zustande gekommen ist, zu unterscheiden [58] und somit kann auch mit ihm keine Aussage über die Ursache der vorhandenen LB-verdächtigen Symptomatik gemacht werden.

In dieser Studie wurden viele verschiedene Testsysteme in den serologischen Vortests eingesetzt. Dabei wurden 83% aller untersuchten Probanden aufgrund ihrer Ergebnisse im

IgG(gesamt)-ELISA in diese Studie aufgenommen und 17 % der Patienten aufgrund ihres Westernblotergebnisses. Bei einer solchen serologischen Vorselektion der Probanden sind zwei Szenarien für mögliche Fehlerquellen denkbar: 1. die verwendeten Vortests waren zu wenig sensitiv aber hoch spezifisch; damit wären Probanden mit einer geringen humoralen Immunantwort von der Studie nicht erfasst worden oder 2. die serologischen Vortests waren zu wenig spezifisch, dann könnten auch seronegative Probanden (falsch positive) mit in die Studie aufgenommen worden sein. Die Probanden dieser Studie wurden aufgrund des Titers des IgG(gesamt)-ELISA und/oder des Westernblots ausgewählt, da diese beiden Methoden als ausreichend spezifisch eingeschätzt werden ([107],[58],[27]) und sich als Screeningmethode am besten für die Borreliendiagnostik eignen [129]. Damit könnten Probanden mit einer geringen humoralen Immunantwort im Vorhinein von der Studie ausgeschlossen worden sein. Bei der Etablierung eines neuen diagnostischen Verfahrens erscheint dieses Szenarium (1.) jedoch sicherer als die Gefahr durch zu wenig spezifische Vortests falsch positive Probanden mit aufgenommen zu haben, die dann die Qualität des Verfahrens mindern könnten.

Bei der Entwicklung der IgG1- bzw. IgG3-ELISA wurde auf eine bereits bewährte mit *B.burgdorferi*-Antigen beschichtete Mikrotiterplatte zurückgegriffen, um mit einer möglichst gleichbleibende hohen Qualität der Materialien arbeiten zu können. Um diese Qualität zu gewährleisten und auch nach der Entwicklung ein diagnostisches Verfahren zu besitzen, das leicht in die Routinediagnostik eingeführt werden kann, wurde die Mikrotiterplatte von Dade Behring verwandt, die in der Studie von Goosens et al. [48] im Vergleich von elf kommerziell erhältlichen ELISA-Systemen die beste Sensitivität und Spezifität zeigte. Diese borrelienspezifische Mikrotiterplatte ist mit Antigen des *B.burgdorferi*-Stammes Pk₀ der Genospezies *B.afzelii* beschichtet. Diese Genospezies, die hauptsächlich in Europa verbreitet ist, unterschied in einer vergleichenden Studie von Hauser et al. [60] Lyme-Borreliose-Patienten von seronegativen Blutspendern von allen verwendeten *B.b.*-Stämme am besten. Weiterhin verglich Hofmann [65] in seiner Studie handelsübliche ELISA, die mit Flagellumantigen beschichtet waren, mit einem Pk₀-beschichteten ELISA. Dabei fand sich bei beiden Testsystemen eine gleich gute Sensitivität und Reproduzierbarkeit. In der Spezifität des Testsystems schnitt der mit Antigenen vom Stamm Pk₀ beschichtete ELISA aber deutlich besser ab, als der mit Flagellumantigen beschichtete ELISA.

Für die Entwicklung der IgG1- bzw. IgG3-ELISA wurde eine mit vielen Antigenen beschichtete Platte ausgewählt, da Jung [70] in ihrer Studie herausgefunden hatte, daß die

IgG1- bzw. IgG3-Subklassenverteilung bei einer Borrelienerkrankung nicht von bestimmten Antigenen abhängig ist.

Dem verwendeten Probenpuffer wurde vom Hersteller ein *Treponema phagedenis*-Ultrasonat zugesetzt, so daß mögliche Kreuzreaktionen schon frühzeitig abgepuffert werden. Dies ist insbesondere erwähnenswert, als in verschiedenen Studien auf die hohe Kreuzreaktivität in der Borreliendiagnostik hingewiesen wird ([3], [28], [92], [134]).

5.3 Pathogenetische Hintergründe der beobachteten serologischen Phänomene

Das Vorherrschen einer IgG3-Dominanz bei seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik im Vergleich zu einer IgG1-Dominanz bei seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik bestätigt die auf anderen Untersuchungen basierende Erwartung, auf Grund derer diese Studie durchgeführt wurde. Es konnte bereits in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, daß Patienten mit einer Borrelienerkrankung mit einer verstärkten $\text{IFN}\gamma$ und einer verminderten IL4-Synthese reagieren ([163], [97],[105]). Die verminderte IL4-Synthese beruht vermutlich auf einer Inaktivierung von TH_2 -Zellen durch die Borrelien. Diese Inaktivierung wiederum ist für eine verminderte Immunantwort und eine Verschlechterung der Krankheit verantwortlich [105].

Eine Anreicherung $\text{IFN}\gamma$ -produzierender TH_1 -Zellen konnte ebenfalls im Liquor von Patienten mit einer Neuroborreliose, sowie in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme-Arthritis in Studien von Yssel [174] und Forsberg [41] gezeigt werden. Da $\text{IFN}\gamma$ die Synthese von IgG3 fördert, die von IgG1 dahingegen hemmt, war mit einer Dominanz dieser Subklasse bei Probanden mit LB-Symptomatik zu rechnen.

Durch Untersuchungen im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß IL4 bzw. IgG1 einen protektiven Effekt bei einer *B.b.*-Infektion hat. Keane-Myers und Nickell [78] sowie Barthold et al. [12] entwickelten C3H-Mäuse, die für *B.burgdorferi* empfänglich sind und nach Infizierung mit *B. burgdorferi* eine schwere Arthritis entwickeln. Diese bildeten verstärkt TH_1 -Zellen und wiesen einen hohen $\text{IFN}\gamma$ -Spiegel auf. BALB-Mäuse, die resistent sind, reagierten hingegen mit einer TH_2 -Zellen-Dominanz und einer ausgeprägten IL4-Produktion und einem erhöhten IgG1-Spiegel. Den Einfluß von IL4 bzw. $\text{IFN}\gamma$ auf den Verlauf einer *B.b.*-Infektion konnten Keane-Myers und Nickel durch die Gabe von Anti-IL4 mAB, bzw. Anti- $\text{IFN}\gamma$ mAB zeigen. IL4 scheint über eine Hemmung des Spirochätenwachstums protektiv zu wirken, da die Blockade dieses Interleukins durch einen Antikörper zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate bei infizierten Mäusen führte und signifikant mehr Spirochäten nachweisbar

waren als in einer infizierten Kontrollgruppe. Die Blockade von IFN γ hingegen senkte die Sterblichkeitsrate und reduzierte die Anzahl nachweisbarer Spirochäten. Es ist anzunehmen, daß bei den seropositiven Probanden ohne LB-Symptomatik die Dominanz von IgG1, dessen Produktion durch IL4 stimuliert wird, vor dem Ausbruch einer klinisch manifesten Lyme-Borreliose-Erkrankung schützt. Über welchen Mechanismus die protektive Wirkung von IL4 bzw. IgG1 zu Stande kommt, ist derzeit noch nicht geklärt.

5.4 Diskussion der Ergebnisse

Zunächst wurden die beiden IgG1- bzw. IgG3 - ELISA anhand von Intra - und Inter-Assay-Präzisionen verschiedener Probanden mit unterschiedlicher Immunantwort auf ihre Leistungsfähigkeit überprüft. Die Überprüfung eines ELISA mittels Intra- und Inter-Assay-Präzision ist ein gängiges Verfahren, das bei vielen anderen kommerziell erhältlichen Testkits verwandt wird (Enzygnost Borreliosis; ICAM-1-ELISA). Bei der Inter-Assay-Präzision ergaben sich bei dem Probanden mit geringer $\Delta OD_{450/650}$ Variationskoeffizientenwerte von über 20%. Bei so geringen $\Delta OD_{450/650}$ -Meßwerten hat eine geringe Abweichung, die aufgrund des geringen Signals und damit der Schwierigkeit der Detektion auftreten kann, schon große Auswirkungen bei der Berechnung von Variationskoeffizienten. Daher sind in diesem Meßbereich höhere Variationskoeffizientenwerte tolerierbar. Ein weiteres Qualitätsmerkmal für ein ELISA-System ist die Verdünnungsechtheit eines Probandenserums über den gesamten Meßbereich hinweg. Auch dieses wird in den kommerziell erhältlichen Tests als Qualitätskontrolle durchgeführt. Dabei sollten sich die Ergebnisse des eingesetzten Serums - in einem Graphen aufgetragen - linear darstellen. Nur wenn diese Verdünnungsechtheit gegeben ist, ist auch mit einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu rechnen. Die IgG1- bzw. IgG3-ELISA zeigten eine gute Verdünnungsechtheit bei mehreren eingesetzten Seren über den gesamten Meßbereich hinweg.

Nach Ermittlung aller Meßergebnisse der Probandengruppen wurden diese miteinander verglichen. Bei dem Vergleich der Syndromgruppen der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik konnten signifikante Unterschiede zwischen den Untergruppen in den Variablen IgG1 und IgG3 gefunden werden. Dabei zeigten die Antikörpertiter der Probanden mit ACA und EM niedrigere Werte als die der Neuroborreliose - und Arthritis-Probanden. Dies ist z.T. mit der geringen Anzahl der Probanden in diesen beiden Syndromgruppen erklärbar, so daß geringe Unterschiede schon statistisch signifikant erscheinen. Es wurden keine Korrelationen zwischen den Ergebnissen des im Vortest durchgeführten IgG(gesamt)-ELISA und den Titern

der IgG1-bzw. IgG3-ELISA berechnet, da nicht alle Probanden im IgG(gesamt)-ELISA untersucht worden waren.

Bei der Untersuchung der beiden seropositiven Probandengruppen fiel auf, daß die untersuchten seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik signifikant häufiger eine IgG3-Dominanz aufwiesen. Die Dominanz der spezifischen IgG3-Antikörper deutet auf den kausalen Zusammenhang zwischen einer *B.burgdorferi*-Infektion und der vorhandenen Symptomatik hin. Seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik zeigten dagegen signifikant häufiger eine IgG1-Dominanz. Dies deutet darauf hin, daß bei einem seropositiven Probanden ohne aktuelle LB-verdächtige Symptomatik die IgG1-Subklasse die Immunantwort dominiert. Da die Probanden der seronegativen Gruppe keine borrelienspezifischen Antikörper aufwiesen, wurde von dieser Gruppe kein Q IgG3/IgG1 berechnet. Jung [70] fand in ihrer Studie mittels Westernblot eine Dominanz der IgG1-Subklasse bei Lyme-Borreliose-Patienten und interpretierte diese Ergebnisse dahingehend, daß die verstärkte IgG1-Synthese ein Indikator für eine Lyme-Borreliose sein könnte. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen dieser Studie kann damit erklärt werden, daß bei der Studie von Jung [70] die Antigene durch eine Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt wurden, und dadurch die Antigene unterschiedliche Reaktivitäten zeigen können. Jung [70] setzte in ihrer Studie den Westernblot als eine qualitative Labormethode ein, ohne zu quantifizieren. Somit konnten Aussagen zu Dominanzen einzelner IgG-Subklassen nur anhand von Bandenanzahl und Bandenintensität abgeschätzt werden. Die Aussage über die Ursache der Symptomatik einer Erkrankung ist bei dieser Methode eher kritisch zu betrachten. Eine genauere Quantifizierung der borrelienspezifischen Antikörpern ist dagegen mit IgG1- und IgG3-ELISA möglich. Trotz der seropositiven Voruntersuchungen fielen einige Probanden mit ihren Titern unter die Nachweisgrenzen der IgG1- bzw. IgG3-ELISA. Dies ist zum einen damit erklärbar, daß nicht alle Probanden (17%) vorher mit dem IgG(gesamt)-ELISA untersucht wurden, sondern aufgrund des Westernblotergebnisses mit in die Studie aufgenommen worden sind, und möglicherweise andere Antigene im Westernblot detektiert wurden, als auf der Mikrotiterplatte präsentiert werden. Weiterhin war die Mikrotiterplatte des IgG(gesamt)-ELISA mit Antigen des Stammes B31 beschichtet, während das Antigen der IgG1-bzw. IgG3-ELISA-Platten von der Genospezies *B.burgdorferi* afzelii Stamm Pk₀ stammte. Dieser Unterschied in der Antigenbeschichtung könnte auch ein Grund sein, warum nicht alle Probanden Titer oberhalb der Nachweisgrenzen zeigten. Genau diese Problematik diskutiert auch Babour [10] in seiner Studie. Er weist daraufhin, daß mögliche Unterschiede in

der Antigenbeschichtung mit verschiedenen Genospezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato zu möglichen falsch negativen Ergebnissen führen könnte. Eine andere Erklärung ist, daß häufig Defizite in einzelnen IgG-Subklassen-Konzentrationen vorliegen. Bei dem IgG(gesamt)-ELISA werden alle IgG-Subklassen (IgG1-IgG4) untersucht. Bei den beiden neuen ELISA werden nur IgG1 und IgG3 untersucht. Liegt nun bei einigen Probanden ein absoluter oder relativer Mangel an einer der beiden Subklassen vor, so fällt dies bei dem IgG(gesamt)-ELISA nicht ins Gewicht, bei den beiden IgG1- bzw. IgG3-ELISA jedoch fallen damit die Titer unter die Nachweisgrenzen des Systems.

Um die beiden seropositiven Probandengruppen differenzieren zu können wurde ein Q IgG3/IgG1 mit einem definierten Cut-Off-Wert von 1,2 etabliert. Bei diesem Wert für den Q IgG3/IgG1 betrug die Sensitivität 84% und die Spezifität 74%. Da diese Quotienten stets in Relation gemessen wurden, kann eine Aussage darüber, welche der beiden Subklassen-Titer als Ursache des für die Probandengruppe „falschen“ Quotientenwertes zu hoch oder zu niedrig waren, nicht gemacht werden. Diese nur relativ hohe Sensitivität und Spezifität gerade im Frühstadium der Infektion zeigte sich auch in einer Studie von Goosens [48], in der 11 verschiedene Borrelien-ELISA auf Sensitivität und Spezifität getestet wurden. Dabei zeigte sich gerade im Frühstadium der Infektion (EM) eine deutlich geringe Sensitivität und Spezifität als bei Patienten der Stadien II und III. Ein Grund dafür sehen die Autoren in einer *Borrelia burgdorferi*-spezifischen „langsamen“ Antikörperantwort. Zum anderen weisen die Autoren daraufhin, daß gerade bei Probanden im Frühstadium noch viele unspezifische Antikörper gegen andere Mikroorganismen gebildet werden, die dann z.T. nicht von den ELISA als spezifisch detektiert werden können. Auf diese Problematik verweisen auch Rahn [122] und Babour [10] in ihren Publikationen. Daher war es bei der Betrachtung der Sensitivität davon abhängig, in welchem Stadium einer Lyme-Borreliose sich die Probanden befanden.

Bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik lagen bei Probanden mit autoimmun bedingten und anderen Grunderkrankungen verhältnismäßig mehr Q IgG3/IgG1 oberhalb des Cut-Off-Wertes als bei den Probanden der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik ohne Grunderkrankungen, was auch die Spezifität des Testsystems beeinflusste. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, daß im Laufe einer Multiplen Sklerose, als Beispiel einer autoimmun bedingten Grunderkrankung, eine erhöhte Synthese von polyklonalen Antikörpern bedingt durch eine polyklonale B-Zell-Stimulation stattfindet [90]. Dabei ist es durchaus möglich, daß dabei zufällig borrelienspezifische Antikörper

vermehrt gebildet werden, und dadurch die erregerspezifische Dominanz in den IgG1- bzw. IgG3-Subklassen sich zugunsten von IgG3 verschiebt. Da aber in dieser Studie kein großes Probandenkollektiv mit diesen Grunderkrankungen untersucht wurde, müßte allerdings in einer weiteren Studie näher betrachtet werden, ob dieses Phänomen auch bei einem größeren Probandenkollektiv mit autoimmun bedingten Grunderkrankungen auftritt.

Es wurden in dieser Studie vierundzwanzig Neuroborreliosepatienten in mindestens zwei Messungen untersucht, um herauszufinden, wie sich das gefundene Phänomen der IgG3-Dominanz auch über einen längeren Untersuchungszeitraum darstellt. Bei diesen Verlaufsuntersuchungen konnte bei 79% der Probanden ein Abfall des Q IgG3/IgG1 über den Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Dieser Abfall der Q IgG3/IgG1 ist signifikant. Diese Beobachtung deutet auf den Einfluß einer Therapie auf den Verlauf einer Erkrankung. Im Verlaufe nehmen die LB-verdächtigen Symptome ab, und damit auch der serologische „Indikator“, der Q IgG3/IgG1. Dies bestätigt auch die Hypothese, daß das Dominanzverhältnisse der IgG1- bzw. IgG3-Subklassen ein Indikator für die Detektierbarkeit der LB-verdächtigen Symptomatik darstellen könnte. Dabei scheint der Abstand der Probenentnahmen auf die Höhe des Q IgG3/IgG1 unbedeutend zu sein.

Die IgG3-Dominanz der Testwerte der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik und die IgG1-Dominanz der Testwerte in der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik, die in dieser Studie gefunden wurde, war nicht nur mit Antigenen des Borrelienstammes Pk_o der verwendeten Mikrotiterplatte nachweisbar, sondern auch mit Stämmen (Pbi, Pka II und B31) anderer Genospezies (*B.garinii*, *B.b.* sensu stricto). Die Sensitivität der IgG1- bzw. IgG3-ELISA lag bei den drei untersuchten Borrelienstämmen zwischen 79-92% (Pbi - B31 - Pka II) und die Spezifität schwankte je nach Stamm zwischen 75-56% (Pbi - Pka II - B31). Dabei wies der Borrelienstamm B31 die geringste Spezifität auf. Bestätigt wird diese Beobachtung in der Studie von Hauser et al. [60], in der auch der Borrelienstamm B31 die geringste Spezifität bei der Untersuchung von 355 Personen mit verschiedenen Borrelienstämmen in einem IgG(gesamt)-ELISA zeigte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Verteilung der Immunglobulinsubklassen nicht ein genospezies-spezifisches Phänomen ist, sondern *B. burgdorferi* sensu lato-spezifisch zu sein scheint. Weiterhin unterstreicht dies die mögliche breite Anwendbarkeit des neuen diagnostischen Verfahren, auch in Regionen, wie den USA, wo der Stamm Pk_o nicht verbreitet ist.

5.5 Anwendungsmöglichkeiten des neuen diagnostischen Verfahrens

Diese Studie stellt ein neues diagnostisches Verfahren für die Borreliendiagnostik vor, mit dem man Lyme-Borreliose-Patienten mit Hilfe serologischer Methoden erkennen kann. Die entwickelten IgG1-bzw.IgG3-ELISA weisen eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität bei der Abgrenzung von seropositiven Probanden und seronegativen Probanden und zwischen den beiden seropositiven Probandengruppen mit und ohne LB-Symptomatik auf. Diese beiden ELISA müßten, um in die Routinediagnostik aufgenommen zu werden, noch weiter in Bezug auf Sensitivität und Spezifität entwickelt werden. Für den Einsatz des neuen diagnostischen Verfahrens in der Borreliendiagnostik wären dann zwei Anwendungen denkbar:

- Alleindiagnostikum - d.h. Screening (seropositiv-seronegativ) und Identifikation der Symptomatik als Lyme-Borreliose mit den IgG1- und IgG3-ELISA
- Zusatzdiagnostikum - d.h. Screening (seropositiv-seronegativ) mit einem IgG(gesamt)-ELISA. Die Kausalität der Symptomatik als Lyme-Borreliose könnte dann serologisch mit den IgG1- und IgG3-ELISA bewiesen werden.

Die Entscheidung, wie man in der Diagnostik bei Verdacht auf eine Lyme-Borreliose-Erkrankung vorgehen sollte, kann in dieser Studie nicht endgültig getroffen werden, da hier nur retrospektiv Probandenseren untersucht wurden, bei denen vorher bereits die Diagnosen eindeutig feststanden. Ein Screening von „unbekannten“ Seren mit den IgG1- bzw. IgG3-ELISA fand nicht statt. Für diese Entscheidung müßte ein größeres Patientenkollektiv nur mit diesen ELISA auf borrelienspezifische Antikörper untersucht werden, um dann die Sensitivität und Spezifität sowohl in Bezug auf die Differenzierung „seropositiv-seronegativ“ als auch auf die Erkennung von Lyme-Borreliose-Patienten, zu ermitteln. Dann könnte man die einzelnen Vorgehensweisen vergleichen, und eine Empfehlung zur Vorgehensweise in der Routinediagnostik aussprechen. Da man aber die Spezifität bei der Verwendung des in dieser Studie entwickelten Verfahrens als Zusatzdiagnostikum zu Lasten der Sensitivität erhöhen könnte, ist dies ausgehend von den Ergebnissen der Studie zu empfehlen.

6. Zusammenfassung

Es wurde in dieser Studie ein neues diagnostisches Verfahren in Form zweier borrelienspezifischer IgG1- und IgG3-Subklassen-ELISA (Antigen: Borrelienstamm Pk_o) und deren Auswertung etabliert, um durch mögliche Unterschiede in dem IgG1- und IgG3-Subklassenverhältnis in Bezug zur klinischen Symptomatik einen neuen diagnostischen Parameter zu finden. Dabei wurden untere Nachweisgrenzen für die beiden ELISA festgelegt, mit Hilfe derer eine Differenzierung der seronegativen und seropositiven Probandengruppen möglich war (Sensitivität 83%; Spezifität 80%). Weiterhin wurde das diagnostische Verfahren durch Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Präzisionen und der Überprüfung der Verdünnungsechtheit auf die Leistungsfähigkeit überprüft. Es wurden mit den IgG1- und IgG3-ELISA 219 Probanden untersucht, die in drei Gruppen aufgeteilt wurden: die seropositive Probandengruppe mit LB-Symptomatik (n=82), die seropositive Probandengruppe ohne LB-Symptomatik (n=62) und die seronegative Probandengruppe (n=75). Dabei wurden in diesen Gruppen nach Syndromen aufgeteilte Untergruppen gebildet und miteinander verglichen. Alle Probanden wurden mittels IgG(gesamt)-ELISA oder Westernblot auf borrelienspezifische Antikörpertiter voruntersucht. Bei den beiden seropositiven Probandengruppen wurden IgG3/IgG1-Quotienten gebildet und miteinander verglichen. Die Trennung der beiden seropositiven Probandengruppen wurde durch Bestimmung eines Cut-Off-Wertes möglich, der bei einem Q IgG3/IgG1 von 1,2 festgesetzt wurde (Sensitivität 84% und Spezifität 74%). Die Gruppe der seropositiven Probanden mit LB-Symptomatik wies signifikant höhere Q IgG3/IgG1-Werte als die seropositive Probandengruppe ohne LB-Symptomatik auf ($p < 0,0001$).

Bei 24 Neuroborreliosepatienten wurde das IgG3/IgG1-Verhältnis über einen Zeitraum von 1-21 Monaten beobachtet. In 79% der Fälle nahmen die Q IgG3/IgG1-Werte ab.

Bei 40 Probanden (24 seropositive Probanden mit LB-Symptomatik und 16 seropositive Probanden ohne LB-Symptomatik) wurde das IgG3/IgG1-Verhältnis nicht nur mit Antigen des Vertreters des *B.burgdorferi* Stammes Pk_o beschichteten Mikrotiterplatten untersucht, sondern auch mit Antigenen dreier anderer *B.burgdorferi* Stämme: B31, Pka II und Pbi. Dabei konnte auch bei diesen Untersuchungen signifikant höhere Q IgG3/IgG1-Werte bei der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik gegenüber den Probanden der seropositiven Gruppe ohne LB-Symptomatik ermittelt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß es durch Etablierung dieses neuen diagnostischen Verfahrens erstmalig die Erkennung von LB-Patienten mit Hilfe serologischer Mittel gelungen ist.

7. Summary

This study establishes a new diagnostic procedure in the form of two *borrelia burgdorferi* specific IgG1- and IgG3- subgroup-ELISA (antigen: *borrelia burgdorferi* strain Pk₀), respectively, and their analysis. This was done to find a new diagnostic parameter via possible differences in the relation of IgG1 and IgG3 subgroups correlated to the clinical picture. Lower end detection levels for both ELISA were determined which allow a differentiation between seronegative and seropositive groups of test persons (sensitivity 83%, specificity 80%). In addition, the diagnostic procedure was validated by determination of intra- and inter-assay-precision and by checking the dilution validity for performance.

A total of 219 test persons were divided into three groups and tested with both IgG1- and IgG3-ELISA: a seropositive group of test persons with symptoms of Lyme disease (n = 82), a seropositive group without symptoms of Lyme disease (n = 62), and a seronegative group (n = 75). Within these groups subgroups were established according to syndromes and were compared. All test persons were pretested for borrelia specific antibodies via IgG (total)-ELISA or Westernblot. For the two seropositive groups IgG3/IgG1 ratios were calculated and compared. Differentiation between the two seropositive groups was possible by establishing a cut-off-value which was set at an IgG3/IgG1 ratio of 1,2 (sensitivity 84% and specificity 74%). The seropositive group with symptoms of Lyme disease had a significant higher IgG3/IgG1 ratio as compared to the seropositive group without symptoms of Lyme disease (p < 0,0001).

For 24 patients with neuroborreliosis the IgG3/IgG1 ratio was observed for a period from 1 to 21 months. In 79 % of the cases the IgG3/IgG1 value decreased.

In 40 test persons (24 seropositive test persons with symptoms of Lyme disease and 16 seropositive test persons without symptoms of Lyme disease) the IgG3/IgG1 ratio was not only determined by using microtiter dishes coated with antigens of *B. burgdorferi* strain Pk₀; in addition, they were investigated by using antigens of three more *B. burgdorferi* strains: B31, Pka II and Pbi. Here, too, significant higher IgG3/IgG1 ratios were found when comparing the seropositive group with symptoms of Lyme disease with the seropositive group without symptoms of Lyme disease.

The results of this study show for the first time the identification of patients with symptoms of Lyme disease using serological means, via the establishment of this new diagnostic procedure.

8. Literaturverzeichnis

1. Aceti A., Pennica A., Teggi A., Fondacaro L.M., Caferro M., Leri O., Tacchi G., Celestino D., Quaranta G., De Rosa F.; IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response; *Int. Arch. Allergy. Immunol.* 1993;102(4): 347-351
2. Afzelius A.; Report zu Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm am 16. Dezember 1909. *Arch. Derm. Syph.* 1909; 101:405-406
3. Alfen I.; Erregerspezifische und kreuzreagierende Antigene von *Borrelia burgdorferi* und ihre Bedeutung für die serologische Diagnostik; Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig Universität Gießen, 1992
4. Alfen I., Wellensiek H.J.; Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und die Syphilis; Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Leipzig; 28.-30. September 1992
5. Atamer C.; Die humorale Immunantwort bei asymptomatischen *Borrelia burgdorferi* Infektionen: Eine epidemiologische und immunologische Studie an Blutspendern; Dissertation an der Justus-Liebig Universität Gießen, 1994
6. Bannwarth A.; Zur Klinik und Pathogenese der „chronischen lymphocytären Meningitis“; *Arch. Psychiatr. Nervenkr.*, 1944; 117: 161-185
7. Barrett D.J., Ayoub E.M.; IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides; *Clin. Exp. Immunol.* 1986;63:127-134
8. Baranton G., Ras N.M., Postic D.; Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis; *Wien. Klin. Wochenschr.* 1998; 110,24: 850-855
9. Baranton G., Postic D., Saint-Giorns I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A.D.; Deliniation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii sp. nov.*, and group VS461 associated with Lyme Borreliosis; *Int. J. Sys. Bacteriol.* 1992; 42: 378-383
10. Babour A.G. ; Laboratory aspects of Lyme Borreliosis; *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988; Vol.1, (4): 399-414
11. Barbour A.G., Burgdorfer W., Hayes S.F., Peter O., Aeschlimann A.; Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland; *Curr. Microbiol.* 1983; 8: 123-126
12. Barthold S.W., Beck D.S., Hansen G.M., Terwilliger G.A., Moody K.D.; Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice; *J. Infect. Dis.* 1990; 162,1: 133-138
13. Baughn R.E., Jorizzo J.L., Adams C.H., Musher D.M.; IgG class and subclass responses to *Treponema palladium* in patients with syphilis; *J. Clin. Immun.* 1988; Vol 8.No.2: 128-139

14. Bergström S., Sjöstedt A., Dotevall L., Kaiser B., Ekstrand-Hammarström B., Wallberg C., Skogman G., Barbour A.G.; Diagnosis of Lyme Borreliosis by an Enzyme Immunoassay Detecting Immunoglobulin G reactive to purified *Borrelia burgdorferi* Cell Components; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., May 1991; Vol.10 No.5:422-427
15. Blenk H., Dutschak H., Kley R., Schleich T.; Erfolgskontrolle einer Langzeitbehandlung bei Lyme-Borreliose mittels Blottitration; Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: Frankfurt am Main 19.5.1995
16. Bödecker R.H., Frenz I.; Einführung in die medizinische Statistik; Aus dem Institut für medizinische Informatik des Klinikums der JLU Gießen,1993
17. Bradwell A.R.; IgG and IgA Subclasses in Disease; The Binding Site 1995
18. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.; Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1992; 11: 224-232
19. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grundwaldt E., Davis J.P.; Lyme disease - a tick borne spirochetosis?; Science 1982; 216: 1317-1319
20. Busch D.H., Jassoy Ch., Brinckmann U., Girschick H., Huppertz H.I.; Detection of *Borrelia burgdorferi* - specific CD 8 + Cytotoxic T Cells in Patients with Lyme Arthritis; J. Immun.1996 July 25; 3534-3541
21. Camacho M.T., Outschoorn I., Tellez A.; Role of immunoglobulin G subclasses in Q fever; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.,1995;14,1070-1075
22. Center for disease control and Prevention (CDC); Lyme disease: Epidemiology; <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbib/lymeepi.htm>
23. Chary-Valchenaere I., Jaubhac B., Monteil H., Pourel J.; Diagnosis of Lyme disease: Current difficulties and prospects; Rev. Rheum. Engl.1992;62: 271-280
24. Christen, H.J., Hanefeld F., Eiffert H., Thomssen R.; Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis; Acta - Paediatr. Suppl. 1993; 386: 1- 75
25. Cimmino M.A.,Fumarola D., Sambri V., Accardo S.; The epidemiology of Lyme Borreliosis in Italy; Microbiologica 1992; 15:419-424
26. Clark E.A., Ledbetter J.A.; How B and T cells talk to each other; Nature 1994; 367: 425-428
27. Coleman R.M., Nahmias A.J., Williams S.C., Phillips D.J., Black C.M., Reimer C.B.; IgG subclass antibodies to *Herpes simplex*; J. Infect. Dis. 1985; 151: 929-936
28. Craft J.E., Grodzicki R.L., Steere A.C.; Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests; J. Infect. Dis.1984; 149:789-795

29. Dattwayler R.J., Volkman D.J., Luft B.J., Halperin J.J.; Lyme disease in Europe and North America; *Lancet* 1987; I:681
30. Dattwayler R.J., Luft B.J.; Immundiagnosis of Lyme Borreliosis; *Rheum. Dis. Clin. of N. A.* 1989; 15, No.4.: 11
31. Dinerman H., Steere A.C.; Lyme disease associated with fibromyalgia; *Ann. Intern. Med.*; 1992; 117,4: 281-285
32. Dixon W.J.; *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*; University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London 1993
33. Dressler, F., Whalen J., Reinhardt B., Steere A.C.; Western Blotting in the serodiagnosis of Lyme disease; *J. Infect. Dis.* 1993, 167:392-400
34. Dressler F., Ackermann R., Steere A.C.; Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme-Borreliosis; *J. Infect. Dis.* 1994; 169,2: 313-318
35. Eiffert H., Hanefeld F., Thomssen R., Christen H.-J.; Reinfection in Lyme-Borreliosis; *Inf.* 1996;24,6, 437-439
36. Engelsing A.M.; Klinik und serologische Diagnostik der Neuroborreliose anhand des Immunoblotverfahrens; Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1995
37. Fahrer H., van-der-Linden S.M., Sauvain M.J., Gern L., Zhioua E., Aeschlimann A.; The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme-Borreliosis in a Population at risk; *J. Infect. Dis.*; 1991; 163,2: 305-310
38. Fawcett P.T., Rose C.D., Gibney K.M., Doughty R.A.; Correlation of Seroreactivity with response to Antibiotics in Pediatric Lyme-Borreliosis; *Clin. and Diag. Lab. Immun.* 1997;1: 85-88
39. Feder H.M., Gerber N.M., Luger S.W., Ryan R.W.; Persistense of serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme disease; *J. Clin. Infect. Dis.*1992;15:788-793
40. Feinstein A., Richardson N.E., Taussing M.J.; Immunglobulin flexibility in complement activation; *Immunol. Today* 1986; 7: 169-174
41. Forsberg P., Ernerdh J., Ekerfelt C., Roberg M., Vrethem M., Bergstrom S.; The outersurface proteins of Lyme disease spirochetes stimulate T cells to secrete interferon gamma (IFN- γ): diagnostic and pathogenic implications; *Clin. Exp. Immunol.*1995; 101,3: 453-460
42. French M.; Serum IgG subclasses in normal adults; *Monogr. Allergy* 1986; 19: 169- 174

43. Frey A.B., Rao T.D.; Single exposure of mice to *Borrelia burgdorferi* elicits immunoglobulin G antibodies characteristic of secondary immune response without production of interleukin-4 by immun T cells; *Infect. Immun.* 1995; 63,7,: 2596-2603
44. Garin C., Bujadoux; Paralysis par les tiques; *J. Med. Lyon* 1922; 1:765-767
45. Germain R.N., Margulies D.H.; The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation; *Ann. Rev. Immunol.* 1993; 11: 403-450
46. Golde W.T., Dolan M.C.; Variation in antigenicity and infectivity of derivatives of *Borrelia burgdorferi*, strain B31, maintained in the natural zoonotic cycle compared with maintenance in culture; *Infect. Immun.* 1995;63:4795-4801
47. Golde W.T., Robinson-Dunn B., Stobierski M.G., Dykhuizen D., Wang I-N., Carlson V., Stiefel H., Shiflett S., Campell G.L.; Culture-Confirmed Reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi*; *J. Clin. Microbiol.* 1998; Vol.36,4:1015-1019
48. Goosens H., van den Bogaard A., Nohlmans M.; Evaluation of fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme Borreliosis; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 18: 551 - 560
49. Grauballe P.C., Hornsleth A., Hjelt K., Krasilnikoff P.A.; Detection by ELISA of immunoglobulin G subclass specific antibody response in rotavirus infection in children; *J. med. Virol.* 1986;18,3: 277-281
50. Grodzniki R.L., Steere A.L.; Comparison of Immunoblotting and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay using different Antigen Preparations for Diagnosing early Lyme Disease; *J. Infect. Dis.* 1988; 153,790-797
51. Gutierrez J., Guerrero M., Nunez F., Soto M.J., Piedrola G., Maroto M.C.; Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in European populations; *J. Clin. Lab. Anal.*, 2000;14,1:20-26
52. Hamann-Brand A., Breitner S., Schulze J., Brade V.; Laboratory diagnosis of Lyme disease; *Biotest Bulletin* 1995; 5 :127-142
53. Hamilton R.G.; Human IgG-subclass measurements in the clinical laboratory; *Clin.Chem.* 1987; 33,10:1707-1725
54. Hammarström L., Granstrom M., Oxelius V., Persson M.A.A., Smith C.I.E.; IgG subclass distribution of anti-teichonic acid and anti-alpha toxin antibodies in normal and immunodeficient donors; *Clin. Exp. Immunol.* 1984; 55:593-601
55. Hammarström L., Smith C.I.E.; IgG-Subclasses in bacterial infections; *Monogr. Allergy* 1986; 19:122-133
56. Hansen K.; *Borreliose; Manedsskr Prakt Laegegern* 1994: 791- 806; DAKO Glostrup Denmark 1995

57. Hansen K., Hindersson P., Strandberg-Pedersen N.; Measurement of Antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves Serodiagnosis in Lyme disease; J. Clin. Micro. Feb 88;26,2:338-346
58. Hansen K., Cruz M., Link H.; Oligoclonal *Borrelia burgdorferi* - specific IgG antibodies in cerebrospinal fluid in Lyme borreliosis; J. Infect. Dis. 1990; 161,6: 1194-1202
59. Hansen K., Lebech A.M.; Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi* - specific immunoglobulin G,A and M; Ann. Neurol. 1991; 30,2:197-205
60. Hauser U., Krahl H., Peters H., Fingerle V., Wilske B.; Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato; J. Clin. Microbiol. 1998,36:427-436
61. Hassler D.; Lyme-Borreliose in einem europäischen Endemiegebiet; Dtsch. Med. Wsch. 1992;117:767-774
62. Hechemy K.E., Harris H.L., Duerr M.J., Benach J.L., Reimer C.B.; Immunoglobulin G Subclasses specific to *Borrelia burgdorferi* in Patients with Lyme disease; Ann. N.Y. Acad. Scien.; 539:162-169
63. Hofmann H.; Immunoglobuline G subclasses in TBE-infection; Conference of the Europeane Group for Rapid Viral Diagnosis, Brussles, September 1985
64. Hilton E., Tramontano A., DeVoti J., Sood S.K.; Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis; J. Clin. Microbiol. 1997,35:774-776
65. Hofmann H.; Lyme Borreliosis-Problems of Serological Diagnosis; Inf. 1996; 24,6:470-472
66. Horst H.; Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier;1991
67. Hulinska D., Votypka J., Valesova M.: Persistence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in patients with Lyme Arthritis; Zentrbl. Bakteriol. 1999; 289: 301-318
68. Jauris-Heipke S., Rößle B., Wanner G., Habermann Ch., Rössler D., Fingerle V., Lehnert G., Lobentanzer R., Pradel I., Hillenbrand B., Schulte-Spechtel U., Wilske B.; Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: recombinant expression in *E. coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme Borreliosis; Med. Microbiol. Immunol. 1999; 187:213-219
69. Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.; *Borrelia burgdorferi* sp. no.: etiologic agent of Lyme disease; Int. J. Syst. Bacteriol.1984;34: 496-497

70. Jung A.M.; Analyse erregerspezifischer Antikörper und ihre IgG - Subklassen bei *Borrelia burgdorferi* Infektionen; Dissertation an der Justus-Liebig Universität Gießen, 1999
71. Jungblut P.R., Zimney-Arndt U., Zeindl-Eberhart., Stulik J., Koupilova K., Pleißner K.-P., Otto A., Müller E.Ch., Sokolowska-Köhler W., Grabher G., Stöffler G.; Proteomics in human disease; Cancer, heart and infectious diseases; Electrophoresis 1999; 20: 2100 - 2110
72. Junker A.K., Tilley P.; *Varicella-zoster* virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox; J. med. Virol. 1994; 43,2:119-124
73. Kaiser R.; Variable CSF findings in early and late Lyme neuroborreliosis: a follow-up study in 47 patients; J. Neurol. 1994; 242,1:26-36
74. Kaiser R.; Neuroborreliosis; J. Neurol. 1998; 245: 247-255
75. Kaiser R.; FSME und Neuroborreliose; Extracta psychiatrica Heft 2000;4:17-23
76. Kaiser R. und Teilnehmer der Expertenkonferenz; Frühsommermeningoenzephalitis und Lyme-Borreliose-Prävention vor und nach dem Zeckenstich; Dtsch. Med. Wsch. 1998;123:847-853
77. Karlsson M.; Aspects of the diagnosis of Lyme borreliosis. Scand. J. Infect. Dis. 1990;Suppl. 67: 5-41
78. Keane-Myers A., Nickell S.P.; Role of IL-4 and IFN- γ in Modulation of Immunity to *Borrelia burgdorferi* in Mice; J. Immun. 1995;155:2020-2028
79. Keller R.; Immunologie und Immunopathologie; Thieme Verlag Stuttgart, New York 1994:84, 90
80. Kollaritsch H., Stock C., Scheiner O., Stemberger H., Wiedermann G.; Immune response in patients with *amoebiasis*: evaluation of IgG-subclasses; Int. J. Med. Microbiol.1990; 272,4: 535-539
81. Krüger H., Reuss K., Pulz M., Rohrbach E., Pflughaupt K.W., Martin R., Mertens H.G.; Meningoradiculitis and encephalomyelitis due to *Borrelia burgdorferi*: a follow up study of 72 patients over 27 years; J. Neurol. 1989; 236: 322-328
82. Kuiper H., van Dam A.P. Moll van Charante A.W., Nauta N.P., Dankert J.; One year follow-up study to assess the prevalence and incidence of Lyme borreliosis among Dutch forestry workers; Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993 Jun;12,6:413-418
83. Laman J.D., Claasen E.; T-cell-independent and T-cell-dependent humoral immunity. In: Clifford M. Snapper: Cytokine regulation of humoral immunity basic and clinical aspects; Chicester, J.Wiley et Sons Ltd 1996: 23-72

84. Lebech A.M., Hansen K., Wilske B., Theisen M.; Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme-Borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes; *Med. Microbiol. Immunol.* 1994;183: 325-341
85. Leigner K.B., Shapiro J.R., Ramsey D., Halperin A.J., Hogrefe W., Kong L.; Recurrent erythema migrans despite extended antibiotic treatment with minocycline in a patient with persisting *Borrelia burgdorferi* infection; *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993;28:312-331
86. Lesser R.L.; Ocular manifestations of Lyme disease; *Am. J. Med.* 1995 Apr 24; 98,4A:60-62
87. Linde A., Hammarström L., Persson M.A.A.; Smith C.I.E., Sundquist V.A., Wahren B.; Virus-specific antibody activity of different subclasses of immunoglobulin G and A in cytomegalovirus infection; *Infect. Immun.* 1983,42: 237-244
88. Lipschütz B.; Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans); *Arch. Derm. Res.* 1913; 118:349-356
89. Lovrich S.D., Callister S.M., DuChateau B.K., Lim L.C.L., Winfrey J., Day S.P., Schell R.F.; Abilities of OspA proteins from different seroprotective groups of *Borrelia burgdorferi* to protect hamsters from infection; *Infect. Immun.* 1995; 63:2113-2119
90. Losy J., Metha P.D., Wisniewski H.M.; Identification of IgG subclasses oligoclonal bands in multiple sclerosis CSF; *Acta Neurol. Scand.* 1990; 82: 4-8
91. Lucius R., Kern A., Seeber F., Pogonka T., Willenbacher J., Taylor H.R., Pinder M., Ghalib H.W., Schulz-Key H., Soboslay P.; Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov33); *Trop. Med. Parasitol.* 1992; 43,3: 139-145
92. Magnarelli L.A., Anderson J.F., Johnson R.C.; Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections; *J. Infect. Dis.* 1987; 156: 183-188
93. Maiwald M., Oehme B., March O., Petney N., Kimmig P., Naser K., Zappe H., Hassler D., von Knebel Doeberitz M.; Transmission risk of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwestern Germany; *Epidemiol. Infect.* 1998
94. Malawista S.E.; Resolution of lyme arthritis, acute or prolonged: a new look; http://www.rheuma21st.com/archives/Cutting_MalawistaLymeMay2000.html
95. Martini A., Plebani A., Ravelli A., Avanzini M.A., Jefferis R., Zonta L., Notarangelo L.D., Ugazio G., Burgio R.; IgG subclass serum levels in juvenile chronic arthritis; *Ann. Rheum. Dis.* 1986; 45: 400-404
96. Mathiesen T., Linde A., Olding-Stenkvist E., Wahren B.; Specific IgG subclass reactivity in *herpes simplex* encephalitis; *J. Neurol.* 1988; 235,7: 400-406

97. Matyniak J.E., Reiner S.L.; T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme Disease; *J. Exp. Med.* 1994, 181: 1251-1254
98. Mikkila H.O., Seppala I.J., Viljanen M.K., Peltomaa M.P., Karma A.; The expanding clinical spectrum of ocular Lyme-Borreliosis; *Ophthalmology* 2000 Mar; 107,3:581-587
99. Mond J.J., Brunswick M.; A role for IFN- γ and NK-cells in immune responses to T cell regulated antigens type 1 and 2; *Immunol. Rev.* 1987; 99:105-118
100. Morell A., Roth-Wicky B., Skvaril F.; Immunglobulin G subclass restriction of antibodies against hepatitis b surface antigen; *Infect. Immun.* 1983; 39: 565-568
101. Nadelman R.B., Wormser G.P.; Erythema migrans and early Lyme disease; *Ann. J. Med.* 1995; 98:15-23
102. Nadelman R.B., Wormser G.P.; Lyme borreliosis; *Lancet* 1998;352:557-565
103. Nicoloff J.T., Spencer C.A.; Serum TSH Measurement: A 1990 Status Report; *Thyroid Today* 1990; Volume XIII 4:1-12
104. Noelle R.J., Roy M., Shepherd D.M.; A novel ligand on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B-cell; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 6550-6554
105. Oksi J., Savolainen J., Pene J., Bousquet J., Laippala P., Viljanen M.K.; Decreased interleukin-4 and increased gamma interferon production by peripheral blood mononuclear cells of patients with Lyme Disease; *Infect. Immun.* 1996; 64:3620-3623
106. Olsson I., Hammarström L., Smith C.I., Hovmark A., Asbrink E.; IgG subclasses of specific antibodies in Ixodes ricinus-borne borreliosis; *Clin. Exp. Immunol.* 1987; 69,3: 618-623
107. Oschmann P.; Intrathekale Synthese borrelienspezifischer Antikörper - ein Vergleich von Immunoblot, indirektem Immunfluoreszenztest und ELISA; *J. Lab. Med.* 1997;21, 10:528-534
108. Oschmann P.; Diagnostik und Klassifikation der Neuroborreliose; Habilitation an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1999
109. Oschmann P., Kraiczy P.; Lyme-Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis; Unimed Science 1998
110. Oschmann P., Dorndorf W., Hornig C., Schäfer C., Wellensiek H.J., Pflughaupt K.W.; Stages and Syndromes of neuroborreliosis; *J. Neurol.* 1998;245:262-267
111. Pachner A.R., Steere A.C.; The triad of neurologic manifestations of Lyme disease; meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis; *Neurology* 1985; 35:47-53

112. Parker D.C., Purkerson J.M.; B-cell activation and maturation to immunoglobulin secretion; In: Snapper C.M.: Cytokine regulation of humoral immunity: basic and clinical aspects; Chichester J. Wiley et Sons Ltd 1996: 99-108
113. Paul H., Gerth H.J., Ackermann R.; Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*;
Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. 1987; A 263: 473-476
114. Paz A., Sanchez-Andrade R., Panadero R., Suarez J.L., Diez-Banos P., Morrondo P.; Subclass profile of specific IgG antibodies in rats challenged during acute and chronic primary infection with *Fasciola hepatica*; Parasitol. Res. 1999; 85: 770-775
115. Peng Z.K., Naclerio R.M., Norman P.S., Adkinson N.F. Jr; Quantitative IgE- and IgG subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy;
J. Allergy Clin. Immunol. 1992; 89,2: 519-529
116. Persing D.H., Mathiesen D., Podzorski D., Barthold S.W.; Genetic stability of *Borrelia burgdorferi* recovered from chronically infected immunocompetent mice; Infect. Immun. 1994; 62: 3521-3527
117. Pfister H.W., Einhaupl K., Preac-Mursic V., Wilske B., Schierz G.; The spirochetal etiology of lymphocytic meningoradiculitis of Bannwarth (Bannwarth's syndrome);
J. Neurol. 1984; 231: 141-144
118. Pfister H.W., Neubert U., Wilske B., Preac-Mursic V., Einhaupl K.M., Bosario G.D.; Reinfection with *Borrelia burgdorferi*; Lancet 1986 ii: 984-985
119. Plotkin B.J.; Lyme disease and other co-transmitted tick-borne agents;
<http://www.inetce.org/articles/146-000-99-002-H04.html>
120. Pohl P., Schmutzhard E., Stanek G.; Cerebrospinal fluid findings in neurological manifestations of Lyme disease;
Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A 1987; 263: 314-320
121. Radbruch A., Muller W., Rajewsky K.; Class switch recombination is IgG 1 specific on active and inactive IgH loci of IgG I-secreting B-cell blasts;
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 3954-3957
122. Rahn D.; Lyme disease clinical manifestations, diagnosis and treatment;
Seminars in Arthritis and Rheumatism 1991; 20: 201-218
123. Rao T.D., Fischer A., Frey A.B.; CD4+ Th-2 T cells elicited by immunization confer protective immunity to experimental *Borrelia burgdorferi* infection; Am. N.Y. Acad. Sci. 1994; 30: 364-366
124. Ras N.M., Postic D., Ave P., Huerre M., Baranton G.; Antigenic variation of *Borrelia turicatae* Vsp surface lipoproteins occurs in vitro and generates novel serotypes; Res. Microbiol. 2000; Jan-Feb 151,1:5-12

- 125.Rauer S.; Veränderung der Borrelienserologie nach Antibiotikagabe; Vortrag auf dem Erfurter Borreliensymposium 1999
- 126.Reiber H.; Virus - spezifische Antikörper in Liquor und Serum. ELISA -Analytik und Auswertung mittels Antikörper - Index und Quotientendiagramm; Lab. med. 1991;15:204-207
- 127.Rinne H.; Statistische Formelsammlung; Verlag Harri Deutsch,1988
- 128.Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granstrom M., Hauser U. Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J.; A european multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme-Borreliosis; J. Clin. Microbiol. 2000; Jun,38,6: 2097-2102
- 129.Robert Koch Institut; Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der Lyme - Borreliose; Epidemiologisches Bulletin 22/98 (5.6.1998)
- 130.Robert Koch Institut; Merkblatt für Ärzte - Lyme-Borreliose; <http://www.rki.de>
- 131.Robin G., Cohen D., Orr N., Markus I., Slepon R., Ashkenazi S., Keisari Y.; Characterization and Quantitative Analysis of serum IgG Class and Subclass Response to *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* 2a Lipopolysaccharide following Natural *Shigella* Infection; J. Infect. Dis. 1997; 175: 1128-1133
- 132.Roitt I.M.;Leitfaden der Immunologie; Darmstadt 1988: 43
- 133.Rose C.D., Fawcett P.T., Klein J.D., Epps S.C., Caputo G.M., Doughty R.A.; Reinfection in pediatric Lyme-Borreliosis; Ann. Rheum. Dis. 1993;52:695-696
- 134.Russel H., Sampson J.S., Schmid G.P., Wilkinson H.W., Plikaytis B.; Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunfluorescence assay for Lyme disease; J. Infect. Dis. 1984; 149: 465-470
- 135.Salimonou I.S., Williams A.I.O., Osunkoya B.O.; IgG subclass levels in malarian infected Nigerians; Vox. Sang. 1982; 42: 248
- 136.Schaltenbrand G.; Durch Arthropoden übertragene Erkrankungen der Haut und des Nervensystems; Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 1967;72:979-1005
- 137.Schmid G.P.; Epidemiology and clinical similarities of human spirochetal diseases; Rev. Infect. Dis. 11:1460-1469
- 138.Schoenfeld R., Araneo B., Ma Y., Yang L.M., Weiss J.J.; Demonstration of a B-lymphocyte mitogen produced by the Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 1992; 60,2:455-464
- 139.Schutzer S.E., Coyle P.K., Reid P., Holland B.; *Borrelia burgdorferi* - Specific immune Complexes in Acute Lyme Disease; JAMA 1999;282:1942-1946

140. Schwerer B., Neisser A., Bernheimer H.; Distinct Immunglobulin Class and Immunglobulin G Subclass Patterns against Ganglioside GQ1b in Miller Fisher Syndrome following Different Types of Infection; *Infect. Immun.* May 1999: 2414-2420
141. Sondergaard I., Poulsen L.K., Osterballe O., Weeke B.; A computational approach to the description of individual immune responses. IgE and IgG-subclass allergen-specific antibodies formed during immunotherapy; *Allergy* 1991;46,1:10-19
142. Sousa A.O., Henry S., Maroja F.M., Lee F.K., Brum L., Singh M., Lagrange P.H., Aucouturier P.; IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients; *Clin. Exp. Immunol.* 1998;111:48-55
143. Staneck G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granstöm M., Gray E.G.; European Union concerted action on risk assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis; *Wien. Klin. Wochenschr.* 1996, 108/23: 741-747
144. Steere A.C.; Lyme disease; *N. England J. Med.* 1989; 321:586-596
145. Steere A.C., Malawista S.E., Snyder D.R., Andiman W.A.; A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut; *Arthritis Rheum.* 1976; 19: 824
146. Steere A.C., Malawista S.E., Hardin J.A., Ruddy S., Askenase W., Andiman W.A.; Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum; *Ann. Intern. Med.*; 1977; 86: 685-698
147. Steere A.C., Bartenhagen N.H., Craft J.E., Hutchinson G.J., Newman J.H., Pachner A.R., Rahn D.W., Sigal L.H., Taylor E., Malwista S.E.; Clinical manifestations of Lyme disease; *Zentrbl. Bakt. Hyg.* 1986; A 263:205-206
148. Steere A.C., Beradi V.P., Weeks K.E., Logigian E.L., Ackermann R.; Evaluation of the intrathecal antibody response to *Borrelia burgdorferi* as a diagnostic test for Lyme borreliosis; *J. Infect. Dis.* 1990; 161,6: 1203-1209
149. Stein K.E.; Thymus-independent and thymus-dependent response to polysaccharide antigens; *J. Infect. Dis.* 1992; 165: 49-52
150. Stiernstedt G., Gustafsson R., Karlsson M., Svenungsson B., Skoldenberg B.; Clinical manifestations and diagnosis of neuroborreliosis; *Ann. NY. Acad. Sci.* 1988; 539: 46-55
151. Sundquist V.A., Linde A., Wahren B.; Virus-specific immunglobulin G subclasses in herpes simplex and *varicella zoster virus* infection; *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20: 94-98
152. Tibbling G., Link H., Öhman S.; Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. I. Establishment of reference values; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1977; 35: 385-390

153. Torgano G., Vecchi M., Arosio E., Santambrogio D., Ronchi G., Annoni G., Tomasini M., Contessini E., de-Franchis R.; Changes of IgG-bearing cell populations in the portal tracts of patients with chronic liver disease of viral etiology: an evaluation by immunoperoxidase method and computerized image analysis; *Hepatology* 1992; 16,1:19-23
154. Tumani H., Nolker G., Reiber H.; Relevance of cerebrospinal Fluid variables for early diagnosis of neuroborreliosis; *Neurology* 1995; 45: 1663-1670
155. Urbanek R., Dold S.; The key role of IgG4 subclass antibodies in the development of protection against allergic reactions to insect stings; *Monatsschr. Kinderheil.* 1986;134,8: 536-540
156. van-der-Linde M.R.; Lyme carditis: clinical characteristics of 105 cases; *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1991;77: 81-84
157. Wallich R., Helmes C., Schaible U.E., Simon M.M., Moter S.E., Kramer M.D.; Genotypische Variation bei *Borrelia burgdorferi*: Konsequenzen für die molekularbiologische Diagnostik; *Lab.Med.* 1993; 17: 269-276
158. Wakiguchi H., Hisakawa H., Hosokawa T., Kubota H., Kurashige T.; Analysis of IgG subclasses in chronic active *Epstein-Barr virus* infection; *Pediatr. Int.* 2000 Feb; 42,1:21-25
159. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J.; Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications.; *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 Oct; 14,4:633-653
160. Watanakunakorn C., Toliver J. Jr; Lyme arthritis with subarticular cyst formation in metacarpal and metatarsal bones; *South. Med. J.* 1992; 85,2: 187-188
161. Weber K.; Lyme-Borreliose; *Hautarzt* 1986;37:583
162. Westarp M.E., Bartmann P., Kornhuber H.H.; Immunoglobulin-G isotype changes in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS); *Neuroscience Letters* 1994; 173: 124 - 126
163. Widhe M., Ekerfelt C., Forsberg P., Bergström S., Ernerudh J.; IgG Subclasses in Lyme Borreliosis: A Study of Specific IgG Subclass Distribution in an Interferon γ -Predominated Disease; *Scand. J. Immunol.* 1998;47:575-581,
164. Wilske B., Steinhuber R., Fingerle V., Schierz G., Preac-Mursic V., Vanek E., Lorbeer B.; Lyme-Borreliose in Süddeutschland; *Dtsch. Med. Wsch.* 1987;112 :1731-1736
165. Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Kühbeck R., Barbour A.G., Kramer M.; Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*; *Ann. NY. Acad. Sci.* 1988; 539: 126-143

166. Wilske B., Bader L., Pfister H.W., Preac-Mursic V.; Diagnosis of Lyme neuroborreliosis. Detection of intrathecal antibody formation; Fortschr. Med. 1991; 109,22: 441-446
167. Wilske B., Anderson J.F., Baranton G., Babour A.G., Hovind-Hougen K., Johnson R.C., Preac-Mursic V.; Taxonomy of *Borrelia spp.*; Scand. J. Infect. Dis. 1991; Suppl 77: 108-129
168. Wilske B., Preac-Mursic V., Göbel U.B., Graf B., Jauris-Heipke S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G.; An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis; J. Clin. Microbiol. 1993;31:340-350
169. Wilske B., Fingerle V.; Diagnostik der Lyme-Borreliose - Wie Sie den Verdacht auf Borreliose erhärten; Dtsch. Med. Wsch. -Fortschr. Med. 2000,28,15: 318-321
170. Winward K.E., Smith J.L.; Ocular disease in caribbean patients with serologic evidence of lyme borreliosis; J. Clin. Neurol.-Ophthalmology 1989; 9,2: 65-70
171. Yamakoshi T.; Inhibitory activity of mite IgG4, antibody on antigen-induced histamine release from human peripheral blood leukocytes
Nippon-Jibiinkoka-Gakkai-Kaiho. 1992; 95,7: 996-1004
172. Yokota Si., Amano Ki., Hayashi S., Kubota T., Fujii N., Yokochi T.; Human antibody response to *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide: presence of an immunodominant epitope in the polysaccharide chain of lipopolysaccharide; Infect. Immun. 1998 66,6: 3006-3011
173. Yssel H., Nakamoto T., Schneider P., Freitas V., Collins C., Webb D., Mensi N., Soderberg C., Peltz G.; Analysis of t lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patient with lyme arthritis; Int. Immunol. 1990; 2,11: 1081-1089
174. Yssel H., Shanafelt M.C., Soderberg C., Schneider P.V., Anzola J., Peltz G.; *Borrelia burgdorferi* activates a t helper type 1-like t cell subset in lyme arthritis; J. Exp. Med. 1991; 174,3: 593-601
175. Zöller L., Cremer J., Faulde M.; Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme-Borreliosis; Electrophoresis 1993 Sep.;14,9: 937-944
176. Zumstein G., Fuchs R., Hofmann A., Preac Mursic V., Soutschek E., Wilske B.; Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*; Med. Microbiol. Immunol. 1992; 181: 57-7

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

- ACA Acrodermatitis chronica atrophicans
- B31 *Borrelia burgdorferi* Stamm B31 (Genospezies *B.b.* sensu stricto)
- Pka II *Borrelia burgdorferi* Stamm Pka (Genospezies *B.b.* sensu stricto)
- Pk_o *Borrelia burgdorferi* Stamm Pk_o (Genospezies *B.afzelii*)
- Pbi *Borrelia burgdorferi* Stamm Pbi (Genospezies *B.garinii*)
- µl Mikroliter
- ΔOD_{450/650} optische Dichte der Probe gemessen bei 450 nm
(Referenzwellenlänge 650 nm)
- B.b. *Borrelia burgdorferi*
- ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- EM Erythema migrans
- GM-CSF Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-stimmulierender-Faktor
- IFT Immunfluoreszenstest
- IFT - abs Immunfluoreszenstest mit Absorbtion durch *Treponema phagensis*
- IgA Immunglobulin A
- IgD Immunglobulin D
- IgE Immunglobulin E
- IgG Immunglobulin G
- IgG1 Immunglobulinsubklasse G1
- IgG2 Immunglobulinsubklasse G2
- IgG3 Immunglobulinsubklasse G3
- IgG4 Immunglobulinsubklasse G4
- IHA Immunhämagglutinationstest
- IL-1 Interleukin 1
- IL-1β Interleukin 1β
- IL-2 Interleukin 2
- IL-4 Interleukin 4
- IL-5 Interleukin 5
- IL-6 Interleukin 6
- IL-10 Interleukin 10
- IL-13 Interleukin 13

Abkürzungsverzeichnis - Fortsetzung

- IL-IRA Interleukin1-Rezeptor-Antagonist
- INF γ Interferon gamma
- LB Lyme-Borreliose
- LCB Lymphadenosis cutis benigna
- LPS Lipopolysaccharide
- MHCII Major-Histo-Kompatibilitäts-Komplex 2
- MW Mittelwert
- NB Neuroborreliose
- NK Natürliche Killer-Zellen
- Stabwn Standardabweichung
- TGF- β T-cell-growth-factor β
- TH₁ - Zelle T-Helferzelle Typ 1
- TH₂ - Zelle T-Helferzelle Typ 2
- TNFcc Tumor-Nekrose-Faktor

9.2 Reagenzien bei der Entwicklung der IgG1- und IgG3-ELISA

- Probenpuffer
Proben-Puffer für Enzygnost Borreliosis (Tris-Pufferlösung 0,3 mol/l), enthält Ultrasonikat-Antigen aus *Treponema phagedenis*, Dade Behring, Marburg

- Laborkontrollen
 - Menschliches Serum mit Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*; Borrelien - Labor Prof. Dr. Wellensiek, Mikrobiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen
 - Anti-Borrelia-Referenz P/N; Kontroll-Serum, positiv für die IgG-Bestimmung, Humanserum mit spezifischen Antikörpern gegen *B.burgdorferi*, Testkit Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg

- Mikrotitergefäße
 - NobioWell -pNPP Borreliosis (IgG/IgM), Endingen
 - Enzygnost Borreliosis Testplatte, Dade Behring, Marburg

- Waschpuffer
Waschlösung POD (Konzentrat): Tween-haltige Phosphat-Pufferlösung; Phenol (max 1g/l) Testkit ,Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg

- Detektionsantikörper
 - Monoklonale Mäuse - Antikörper gegen menschliches IgG1 und IgG3 an Biotin gebunden, Sigma , St. Louis, USA
 - Monoklonale Mäuse - Antikörper gegen menschliches IgG1 und IgG3, markiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), CLB, Amsterdam, Nr. MH 161 -1 ME, MH 163 -1 ME
 - Monoklonale Mäuse Antikörper gegen menschliches IgG1 und IgG3, markiert mit Meerrettichperoxidase, Binding Site, Birmingham, Nr. MP 003, MP 006
 - Monoklonale Mäuse - Antikörper gegen menschliches IgG1 und IgG3 , markiert mit Meerrettichperoxidase, Southern Biotechnology Associates, Birmingham Nr. 9210-05, 9050-05

- Konjugatpuffer
Konjugat.Puffer Microbiol.(EDTA 37 mg/l in Phosphat-Pufferlösung 0,01 mol/l), Testkit Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg

Reagenzien bei der Entwicklung der IgG1- und IgG3-ELISA -Fortsetzung

- Substrat
 - Puffer/Substrat TMB: Wasserstoffperoxid (ca. 0,1 g/l) in Natrium-Acetat-Pufferlösung, Testkit Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg
 - Chromogen TMB: Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid (ca. 5 g/l), Testkit Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg

- Stopplösung

Stopplösung POD: 0,5 N Schwefelsäure, Testkit Enzygnost Borreliosis, Dade Behring, Marburg

9.3 Statistische Auswertungen der Probandendaten

Tabelle 19: Korrelationen nach Spearman zwischen IgG1-bzw. IgG3-Titern und dem Symptombeginn bei der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik

Titer		Symptombeginn
IgG3	Korrelationskoeffizient	0,202
	Sig. (2-seitig)	0,195
	N	43
IgG1	Korrelationskoeffizient	0,095
	Sig. (2-seitig)	0,545
	N	43
Q IgG3/IgG1	Korrelationskoeffizient	0,127
	Sig. (2-seitig)	0,433
	N	40

Tabelle 20: Kruskal-Wallis-Test

	Signifikanz
IgG3	0,006
IgG1	0,020
Q IgG3/IgG1	0,803

Tabelle 21: Korrelationen nach Spearman bei der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik

Korrelationen nach Spearman		Alter
IgG3	Korrelationskoeffizient	-0,027
	Sig. (2-seitig)	0,817
	N	82
IgG1	Korrelationskoeffizient	-0,042
	Sig. (2-seitig)	0,719
	N	82
Q IgG3/IgG1	Korrelationskoeffizient	0,017
	Sig. (2-seitig)	0,890
	N	73

Tabelle 22: Mann-Whitney-U-Test bei der seropositiven Probandengruppe mit LB-Symptomatik

	Geschlecht
IgG3	0,897
IgG1	0,901
Q IgG3/IgG1	0,995

Tabelle 23: Korrelationen nach Spearman bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik

Korrelationen nach Spearman		Alter
IgG3	Korrelationskoeffizient	-0,065
	Sig. (2-seitig)	0,661
	N	62
IgG1	Korrelationskoeffizient	-0,318
	Sig. (2-seitig)	0,028
	N	62
Q IgG3/IgG1	Korrelationskoeffizient	0,181
	Sig. (2-seitig)	0,284
	N	46

Tabelle 24: Mann-Whitney-U-Test bei der seropositiven Probandengruppe ohne LB-Symptomatik

	Geschlecht
IgG3	0,001
IgG1	0,080
Q IgG3/IgG1	0,181

Tabelle 25: Korrelationen nach Spearman bei der seronegative Probandengruppe

Korrelationen nach Spearman		Alter
IgG3	Korrelationskoeffizient	-0,024
	Sig. (2-seitig)	0,870
	N	75
IgG1	Korrelationskoeffizient	-0,204
	Sig. (2-seitig)	0,151
	N	75
Q IgG3/IgG1	Korrelationskoeffizient	-
	Sig. (2-seitig)	-
	N	0

Tabelle 26: Mann-Whitney-U-Test bei der seronegative Probandengruppe

	Geschlecht
IgG3	0,153
IgG1	0,002
Q IgG3/IgG1	-

Tabelle 27 : Test auf Normalverteilung der Probanden (Kolmogorov-Smirnov-Test)

	Probandengruppe	Signifikanz
Geschlecht	seropositive Probanden <u>mit</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seropositive Probanden <u>ohne</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seronegative Probanden	0,0001
Alter	seropositive Probanden <u>mit</u> LB-Symptomatik	0,012
	seropositive Probanden <u>ohne</u> LB-Symptomatik	0,200
	seronegative Probanden	0,003
IgG3	seropositive Probanden <u>mit</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seropositive Probanden <u>ohne</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seronegative Probanden	0,0001
IgG1	seropositive Probanden <u>mit</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seropositive Probanden <u>ohne</u> LB-Symptomatik	0,003
	seronegative Probanden	0,0001
Q IgG3/IgG1	seropositive Probanden <u>mit</u> LB-Symptomatik	0,0001
	seropositive Probanden <u>ohne</u> LB-Symptomatik	0,0001
Symptombeginn	seropositive Probanden mit LB-Symptomatik	0,0001

Tabelle 28: Wilcoxon-Test

	Ränge	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Quotient ZP 2 - Quotient ZP 1	Negative Ränge	6	3,5	21
	Positive Ränge	0	0	0
	Bindungen	18		
	Gesamt	24		

Statistik für diesen Test

	Quotient ZP 2 - Quotient ZP 1
Signifikanz (2-seitig)	0,014

Danksagung

Herrn Priv.Doz. Dr. Oschmann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, die Betreuung und die Hilfe bei der Bearbeitung.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Baljer danke ich für die Vertretung der Arbeit gegenüber dem Fachbereich Veterinärmedizin und seiner ratgebenden Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bauerfeind. Seine umfassenden Korrekturen und seine freundliche und ratgebende Unterstützung waren mir bei der Gestaltung der Arbeit eine große Hilfe.

Herrn Dr. Peters danke ich sehr für seine Kooperationsbereitschaft und stets ratgebende und gewissenhafte Unterstützung.

Auch Herrn Prof. Dr. Wellensiek und Herrn Dr. Dopatka danke ich für ihre Unterstützung und beratende Hilfe.

Für die statistische Ausarbeitung der Daten bedanke ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biomathematik, Herrn Dr.Failing und Herrn Heiter.

Bei allen Mitarbeiterinnen des Neurochemischen Liquorlabors bedanke ich mich herzlichst für die freundliche Unterstützung, dem immer offenen Ohr und der nie enden wollenden Geduld mir gegenüber.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitdoktoranden für das außerordentlich kollegiale Arbeitsklima und die mir stets entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei allen meinen Freunden, Bekannten und Kollegen bedanken, die mich bei der Arbeit stets voll unterstützt haben.